

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Fisiología (Fisiología Animal II)



**MELATONINA EN LA REGULACIÓN DE LAS
RESPUESTAS AL ESTRÉS EN TELEÓSTEOS :
EFECTOS COMPORTAMENTALES Y ACCIONES EN
EL EJE HIPOTÁLAMO-HIPÓFISIS-INTERRENAL**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

Clara Azpeleta Noriega

Bajo la dirección de los doctores

**María Jesús Delgado Saavedra
Nuria de Pedro Ormeño**

MADRID, 2013

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA (FISIOLÓGÍA ANIMAL II)



**MELATONINA EN LA REGULACIÓN DE LAS
RESPUESTAS AL ESTRÉS EN TELEÓSTEOS.
EFECTOS COMPORTAMENTALES Y ACCIONES EN
EL EJE HIPOTÁLAMO-HIPÓFISIS-INTERRENAL**

MEMORIA PRESENTADA POR CLARA AZPELETA
NORIEGA PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR EN
BIOLOGÍA POR LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE
MADRID

MADRID, 2013

COMPLUTENSE UNIVERSITY OF MADRID
FACULTY OF BIOLOGICAL SCIENCES
DEPARTMENT OF PHYSIOLOGY (ANIMAL PHYSIOLOGY II)



**MELATONIN IN THE REGULATION OF STRESS
RESPONSES IN TELEOSTS. EFFECTS ON
BEHAVIOUR AND HYPOTHALAMUS-PITUITARY-
INTERRENAL AXIS**

THESIS PRESENTED BY CLARA AZPELETA NORIEGA TO
OBTAIN THE DOCTORATE DEGREE IN BIOLOGY BY
COMPLUTENSE UNIVERSITY OF MADRID

MADRID, 2013



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA (FISIOLÓGÍA ANIMAL II)
C/ JOSÉ ANTONIO NOVAIS, 2
28040 – MADRID

M^a Jesús Delgado Saavedra, Catedrática de la Universidad Complutense de Madrid, y
Nuria de Pedro Ormeño, Profesora Titular de la Universidad Complutense de Madrid,

AUTORIZAN:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada “Melatonina en la regulación de las respuestas al estrés en teleósteos. Efectos comportamentales y acciones en el eje hipotálamo-hipófisis-interrenal” realizada por D^a Clara Azpeleta Noriega bajo nuestra dirección y supervisión en el Departamento de Fisiología (Fisiología Animal II) para la obtención del título de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid.

En Madrid, a 2 de abril de 2013.

Dra. María Jesús Delgado Saavedra

Dra. Nuria de Pedro Ormeño



Comunidad de Madrid



La presente Tesis Doctoral ha sido realizada en el Departamento de Fisiología (Fisiología Animal II) de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Complutense de Madrid, bajo la dirección de la Dra. M^a Jesús Delgado Saavedra, y la codirección de la Dra. Nuria de Pedro Ormeño. Este trabajo se realizó con ayuda del apoyo económico del Ministerio de Ciencia e Innovación (proyectos AGL2007-65744-C03-03 y AGL2010-22247-C03-02/ACU) y de la Universidad Complutense de Madrid/Comunidad Autónoma de Madrid (proyecto CCG07-UCM/AGR-2500). Clara Azpeleta Noriega ha sido beneficiaria de una beca de Formación de Personal Universitario (AP2006-01356) del Ministerio de Educación y Ciencia.

ABREVIATURAS

• ρ	coeficiente de correlación de Spearman.
• τ	periodo.
• 12L:12D	12 horas de luz:12 horas de oscuridad.
• 24D	24 horas de oscuridad.
• 24L	24 horas de luz.
• 3 β HSD	3- β -hidroxiesteroide deshidrogenasa.
• 5-HIAA	ácido 5-hidroxiindol acético.
• 5-HT	5-hidroxitriptamina o serotonina.
• A	adrenalina.
• AANAT	arilalquilamina-N-acetiltransferasa.
• ACTH	adrenocorticotropina u hormona adrenocorticotropa.
• ADN	ácido desoxirribonucleico.
• ADNasa	desoxirribonucleasa.
• ADNc	ADN complementario.
• AMPc	adenosín monofosfato cíclico.
• ANOVA	análisis de la varianza.
• ARN	ácido ribonucleico.
• ARNasa	ribonucleasa.
• ARNm	ARN mensajero.
• <i>bmal1</i>	gen <i>brain-muscle-arnt-like protein 1</i> .
• BSA	albúmina de suero bovino.
• Bu ₂ -AMPc	di-butilil AMPc.
• C	citosa.
• CCG	gen controlado por el reloj.
• <i>clock</i>	gen <i>circadian locomotor output cycle kaput</i> .
• CRF o CRH	factor u hormona liberadora de corticotropina.
• CRF-R1	receptor de CRF tipo 1.
• CRF-R2	receptor de CRF tipo 2.
• CRF-BP	proteínas de unión a CRF.
• <i>cry</i>	gen <i>cryptochrome</i> .
• Ct	ciclo umbral.
• CT	tiempo circadiano.
• DA	dopamina.
• DEPC	dietil pirocarbonato.
• dNTP	desoxirribonucleótido tri-fosfato.
• DOPAC	ácido dihidroxifenilacético.
• DTT	ditiotreitól.
• EDTA	ácido etilendiaminotetraacético.
• e.e.m.	error estándar de la media.
• ELISA	enzimoinmunoensayo.
• FAA	actividad anticipatoria al alimento.
• FEO	oscilador sincronizable por el alimento.
• G	guanina.
• GABA	ácido γ -aminobutírico.
• GH	hormona de crecimiento.
• GR	receptor de glucocorticoides.
• HEPES	ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazin etanosulfónico.
• HPA	eje hipotálamo-hipófisis-adrenal.
• HPI	eje hipotálamo-hipófisis-interrenal.
• HPLC-EC	cromatografía líquida de alta resolución con detección electroquímica.
• ICV	intracerebroventricular.
• IP	intraperitoneal.
• L-DOPA	L-3,4-dihidroxifenilalanina.
• LEO	oscilador sincronizable por la luz.

• LUZ	luzindol.
• MC2R	receptor de melanocortinas tipo 2.
• MCR	receptor de melanocortinas.
• MEL	melatonina.
• MT1	receptor de melatonina tipo 1.
• MOPS	ácido 3-(N-morfolino) propanosulfónico.
• MR	receptor de mineralocorticoides.
• MS-222	tricaina-metanosulfonato.
• MSH	hormona estimuladora de melanóforos.
• MRAP	proteínas accesorias del receptor de melanocortinas.
• NA	noradrenalina.
• NADP	nicotinamida adenina dinucleótido fosfato.
• NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information.</i>
• NPY	neuropéptido Y.
• NSQ	núcleo supraquiasmático.
• p/v	peso/volumen.
• P450scc	desmolasa.
• pb	pares de bases.
• pc	peso corporal.
• PCR	reacción en cadena de la polimerasa.
• PEG	polietilenglicol.
• <i>per</i>	gen <i>period</i> .
• PIPES	ácido piperacín-1,4-bis(2-etanosulfónico).
• PKA	proteína quinasa A.
• PKC	proteína quinasa C.
• POMC	proopiomelanocortina.
• qRT-PCR	PCR cuantitativa en tiempo real.
• REV-ERB α	receptor nuclear subfamilia 1, grupo D, miembro 1.
• RIA	radioinmunoensayo.
• ROR	receptor huérfano relacionado con RAR.
• RORE	elemento de respuesta al receptor huérfano relacionado con el ácido retinoico.
• RT	retrotranscripción.
• StAR	proteína aguda reguladora de la esteroidogénesis.
• TM	dominio transmembrana.
• ur	unidades relativas.
• UV	ultravioleta.
• ZT	tiempo <i>zeitgeber</i> .

I. INTRODUCCIÓN	1
1. ESTRÉS Y EJE HIPOTÁLAMO-HIPÓFISIS-INTERRENAL	3
1.1. CONCEPTO Y TIPOS DE ESTRÉS	3
1.2. EJE HIPOTÁLAMO-HIPÓFISIS-INTERRENAL	5
1.2.1. Hipotálamo	5
1.2.2. Hipófisis	7
1.2.3. Tejido interrenal	8
1.2.3.1. Tejido esteroideogénico: cortisol	9
1.2.3.2. Tejido cromafín: catecolaminas	14
2. SISTEMA CIRCADIANO Y EJE HIPOTÁLAMO-HIPÓFISIS-ADRENAL	16
2.1. ORGANIZACIÓN CIRCADIANA EN LOS PECES	16
2.1.1. Mecanismo molecular de los relojes circadianos	19
2.2. RITMICIDAD EN EL EJE HIPOTÁLAMO-HIPÓFISIS-ADRENAL	21
2.2.1. El reloj biológico de la adrenal	24
2.3. MELATONINA	26
2.3.1. Síntesis, secreción y receptores	26
2.3.2. Efectos de la melatonina en los peces	28
2.3.2.1. Melatonina y actividad locomotora	28
2.3.2.2. Melatonina e ingesta	29
2.3.2.3. Interacciones entre la melatonina y el eje HPI	30
2.3.2.4. Melatonina como sincronizador	32
3. ESPECIES DE ESTUDIO	32
3.1. CARPÍN (<i>Carassius auratus</i>)	32
3.2. TRUCHA ARCO IRIS (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	34
II. OBJETIVOS / OBJECTIVES	37
III. MATERIALES Y MÉTODOS	43
1. MATERIALES	45
1.1. INSTRUMENTAL	45
1.2. PRODUCTOS	47
1.2.1. Reactivos	47
1.2.2. Kits para la valoración de metabolitos y hormonas plasmáticas	50
1.3. MANTENIMIENTO DE LOS PECES	50
2. MÉTODOS	52
2.1. ANESTESIA Y SACRIFICIO	52
2.2. TÉCNICAS DE INYECCIÓN	53

2.2.1. Inyecciones intracerebroventriculares (ICV)	53
2.2.2. Inyecciones intraperitoneales (IP)	53
2.2.3. Preparación de las soluciones inyectables	54
2.2.4. Preparación de los fármacos y hormonas añadidos al medio de cultivo	54
2.3. OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS	55
2.3.1. Sangre	55
2.3.2. Tejidos centrales	55
2.3.3. Riñón	56
2.4. CULTIVOS ORGANOTÍPICOS	56
2.4.1. Cultivo en superfusión	57
2.4.2. Cultivo estático	58
2.5. TÉCNICAS ANALÍTICAS	60
2.5.1. Cuantificación de la ingestión de alimento	60
2.5.2. Valoración de la actividad locomotora	61
2.5.3. Determinación de los niveles plasmáticos de glucosa	64
2.5.4. Determinación de los niveles plasmáticos de lactato	64
2.5.5. Determinación de proteínas	65
2.5.6. Determinación de los niveles de cortisol	66
2.5.6.1. RIA	66
a) Principios generales de la técnica	66
b) RIA: protocolo descrito por Metz y colaboradores (2005)	67
c) Kit Active Cortisol DSL-2000	69
2.5.6.2. ELISA	69
2.5.7. Valoración de monoaminas	71
2.5.8. Técnicas de biología molecular	74
2.5.8.1. Esterilización y limpieza del material	75
2.5.8.2. Electroforesis en geles de agarosa	75
a) Para ARN: gel en condiciones desnaturizantes (gel MOPS)	75
b) Para ADN	76
2.5.8.3. Extracción del ARN	77
2.5.8.4. Tratamiento con ADNasa	78
2.5.8.5. Análisis del ARN	78
2.5.8.6. Retrotranscripción (RT) del ARN a ADNc	80
2.5.8.7. Diseño de cebadores	81
2.5.8.8. Secuenciación parcial del gen del receptor de melanocortinas tipo 2 (<i>mc2r</i>)	82

2.5.8.9. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	83
2.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS	87
2.6.1. Análisis de regresión lineal	87
2.6.2. Test <i>t</i> de Student	87
2.6.3. Análisis de la varianza (ANOVA) y test de comparaciones múltiples ...	87
2.6.4. Análisis de correlación de rango de Spearman	88
2.6.5. Periodogramas	88
2.6.6. Cosinor	89
2.6.7. Grados de significación	90
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	91
<u>CAPÍTULO I. RITMICIDAD DIARIA EN EL EJE HIPOTÁLAMO- HIPÓFISIS-INTERRENAL: EXPRESIÓN DE GENES RELOJ Y DE GENES FUNCIONALES DEL EJE</u>	93
RESUMEN I / SUMMARY I	95
I.1. OBJETIVO	99
I.2. DISEÑO EXPERIMENTAL	99
I.3. RESULTADOS	101
I.4. DISCUSIÓN	113
<u>CAPÍTULO II. TRATAMIENTOS CON MELATONINA Y EJE HIPOTÁLAMO-HIPÓFISIS-INTERRENAL: EFECTOS EN LA EXPRESIÓN GÉNICA, CORTISOL Y ACTIVIDAD LOCOMOTORA</u>	125
RESUMEN II / SUMMARY II	127
II.1. OBJETIVO	131
II.2. EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN IP E ICV DE MEL SOBRE LA ACTIVIDAD LOCOMOTORA Y LOS NIVELES CIRCULANTES DE CORTISOL	131
II.3. EFECTO DE LA RESTRICCIÓN DE ALIMENTO SOBRE LA ACTIVIDAD LOCOMOTORA Y LOS NIVELES PLASMÁTICOS DE CORTISOL	137
II.4. EFECTO DE LA MEL SOBRE LAS RESPUESTAS PRIMARIA Y SECUNDARIA A LA EXPOSICIÓN A UN PROTOCOLO DE ESTRÉS AGUDO	140
II.5. EFECTO DE LA MELATONINA EN LA EXPRESIÓN DE GENES FUNCIONALES DEL EJE HIPOTÁLAMO-HIPÓFISIS-INTERRENAL EN UN MODELO DE ESTRÉS AGUDO	149
II.6. DISCUSIÓN	159

CAPÍTULO III. POSIBLES DIANAS DE LA MELATONINA EN EL EJE HIPOTÁLAMO-HIPÓFISIS-INTERRENAL DE TELEÓSTEOS	173
RESUMEN III / SUMMARY III	175
III.1. OBJETIVO	179
III.2. EFECTO DE LA ACTH SOBRE INDICADORES DE RESPUESTA A ESTRÉS	179
III.3. EFECTO DE LA MELATONINA EN EL INCREMENTO DE CORTISOL PLASMÁTICO INDUCIDO POR LA ACTIVACIÓN DEL EJE HPI CON CRF O ACTH	182
III.4. EFECTO DIRECTO DE LA MELATONINA EN EL TEJIDO INTERRENAL. APROXIMACIONES <i>IN VITRO</i>	185
III.5. DISCUSIÓN	194
CAPÍTULO IV. LA MELATONINA COMO AGENTE SINCRONIZADOR DE LA ACTIVIDAD LOCOMOTORA. EFECTO SOBRE LA EXPRESIÓN DE GENES RELOJ Y EL CONTENIDO DE MONOAMINAS EN TEJIDOS CENTRALES DEL CARPÍN	205
RESUMEN IV / SUMMARY IV	207
IV.1. OBJETIVO	211
IV.2. SINCRONIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD LOCOMOTORA POR MELATONINA	211
IV.3. EFECTOS DE LA MELATONINA EN LA RITMICIDAD DE LA EXPRESIÓN DE GENES RELOJ Y DEL SISTEMA MONOAMINÉRGICO EN EL CARPÍN	222
IV.4. DISCUSIÓN	234
V. CONCLUSIONES / CONCLUSIONS	251
VI. BIBLIOGRAFÍA	257
VII. RESUMEN GENERAL / GENERAL SUMMARY	301

I. INTRODUCCIÓN

1. ESTRÉS Y EJE HIPOTÁLAMO-HIPÓFISIS-INTERRENAL.

1.1. CONCEPTO Y TIPOS DE ESTRÉS.

El estrés puede ser definido como un complejo conjunto de respuestas adaptativas ante una amenaza, real o no, a la integridad fisiológica y psicológica de un individuo, y que aparecen para mantener o restablecer el estado normal u homeostático del mismo (McEwen y Sapolski, 1999; Barton, 2002; Pottinger, 2008). El estrés puede ser de muchos tipos, pero todos ellos actúan sobre el organismo como una amenaza a su homeostasis, de forma que los distintos niveles de respuesta al estrés pueden servir como indicadores de bienestar y calidad de vida de los animales (Wysocki *et al.*, 2006).

Podemos considerar que un **factor estresante** es todo cambio impredecible, de corta o larga duración, de origen endógeno o exógeno (físico, social, infeccioso, doloroso, etc.), que amenaza el equilibrio homeostático y que cuando supera un determinado umbral temporal (Morales *et al.*, 2005) o de intensidad (Greenberg *et al.*, 2002) desencadena una serie de cambios fisiológicos y comportamentales coordinados con el fin de adaptar al animal a dicha amenaza. Estos cambios constituyen de forma global la denominada respuesta integrada al estrés. Cuando existe un desequilibrio entre la severidad del agente estresante y la respuesta generada ante él aparecen las consecuencias negativas derivadas de la exposición al estrés (Pottinger, 2008). En este sentido, es importante diferenciar entre los conceptos de “eustrés”, que es el estrés moderado que resulta estimulante y beneficioso para el organismo permitiendo la supervivencia, y “disestrés”, que es el estrés más intenso o crónico, responsable de la aparición de las consecuencias patológicas (Selye, 1974).

La **respuesta al estrés** no sólo depende de la intensidad del agente estresante, sino también de la susceptibilidad del organismo. Por ello, en ocasiones un mismo factor estresante desencadena respuestas de intensidad muy variable en individuos diferentes (Selye, 1976). El **síndrome general de adaptación** (SGA), propuesto por Selye en 1950, define la cronología general de la respuesta al estrés, considerando tres fases: la fase de alarma (en la que el organismo reconoce al agente estresante como una amenaza a su bienestar), la fase de resistencia (en la que se movilizan los recursos para afrontar la amenaza) y la fase de agotamiento (en la que a pesar de las respuestas activadas se pierde la homeostasis). El SGA se manifiesta en forma de respuestas fisiológicas, que engloban desde aspectos moleculares hasta el nivel social del individuo, y que se clasifican en tres niveles, en función del momento de su aparición y del nivel de afectación del sujeto: respuestas primaria, secundaria y terciaria (Wendelaar Bonga, 1997). La **respuesta primaria** (minutos), implica la activación neuroendocrina que conduce a una rápida liberación a la sangre de

catecolaminas desde las células cromafines, y una liberación más lenta de cortisol, desde las células esteroideogénicas adrenales. Si el estrés persiste, se desencadenarán una serie de **respuestas secundarias**, debidas principalmente a los efectos producidos por las catecolaminas y el cortisol, y que incluyen cambios cardiorrespiratorios (incremento de la frecuencia y el gasto cardíacos, de la frecuencia ventilatoria, del flujo sanguíneo principalmente a los órganos respiratorios), hematológicos (aumento del hematocrito), un aumento de la movilización de hidratos de carbono y lípidos (con el consiguiente incremento en los niveles de glucosa, lactato y ácidos grasos circulantes), etc. La mayoría de estas respuestas se atribuyen a la acción de las catecolaminas, actuando principalmente como estimuladoras del catabolismo. La **respuesta terciaria**, originada tras la exposición a un estrés crónico, produce un agotamiento fisiológico con consecuencias negativas a largo plazo en la función inmune (con la consecuente aparición de patologías), en la reproducción y en el crecimiento, además de una reducción en la capacidad para tolerar otros agentes estresantes adicionales, llegando incluso a poner en peligro la supervivencia del organismo y de la población (Wendelaar Bonga, 1997; Pottinger, 2008; Karakach *et al.*, 2009).

En función de su duración, el estrés puede clasificarse en agudo y crónico. La exposición puntual a un factor estresante genera un **estrés agudo** cuyas respuestas poseen un claro valor adaptativo (Selye, 1976), y que pueden ser tanto específicas de un tipo de agente estresante o de un grupo de agentes relacionados, como inespecíficas, que son las observadas comúnmente frente a tipos de estrés muy diversos. Cuanto más conservada esté la respuesta adaptativa al estrés, más necesaria es para el individuo (Greenberg *et al.*, 2002). Por otra parte, la exposición prolongada a un agente estresante se conoce como **estrés crónico**, generándose una respuesta carente de valor adaptativo, que llega a inhibir ciertos procesos fisiológicos que no representan un beneficio a corto plazo para el organismo (como por ejemplo, el crecimiento o la reproducción) (Tresguerres, 2002). Los animales pueden llegar a habituarse al estrés crónico (Jeffrey *et al.*, 2012) perdiendo, al menos en parte, su capacidad para responder a un estrés agudo posterior (Barcellos *et al.*, 1999; Van der Salm *et al.*, 2006; Osterlund y Spencer, 2011), si bien no siempre se produce esta habituación (Barcellos *et al.*, 2005).

El estrés en los **peces** es un área de estudio de gran interés en la actualidad. Sin embargo, nuestro conocimiento al respecto es aún incompleto, debido a la compleja naturaleza de las respuestas generadas, a las múltiples dianas de actuación y a la influencia de diversos factores ambientales y endógenos (Wendelaar Bonga, 1997; Barton, 2002; Øverli *et al.*, 2005). Una de las grandes aplicaciones del estudio

del estrés en los peces pertenece al ámbito de la acuicultura. En el año 2015, según un informe de la FAO (2004), el 39% del pescado consumido en el mundo procederá de piscifactorías, por lo que resulta esencial tener un conocimiento exhaustivo de los efectos producidos por los factores estresantes a los que inevitablemente se ven expuestos los peces durante su cultivo, con el fin de minimizar su impacto en el sistema productivo.

1.2. EJE HIPOTÁLAMO-HIPÓFISIS-INTERRENAL.

El eje hipotálamo-hipófisis-tejido interrenal (HPI) de los peces teleósteos es el equivalente al eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HPA) de los mamíferos. El punto de partida del funcionamiento de este eje implica la captación de señales que, procedentes de los medios interno y externo al organismo, convergen en los núcleos hipotalámicos implicados en la respuesta al estrés, donde la información es integrada y traducida en una estimulación de la liberación del factor u hormona liberadora de corticotropina (CRF o CRH), principalmente por el área preóptica del hipotálamo. El CRF se une a receptores específicos en las células corticotropas adenohipofisarias, estimulando la síntesis y liberación de adrenocorticotropina u hormona adrenocorticotropa (ACTH). La ACTH es el principal estímulo de las células del tejido interrenal para inducir la liberación de esteroides adrenales (en teleósteos, principalmente el cortisol). Asimismo, en el tejido interrenal existen células cromafines productoras de catecolaminas, que son liberadas en respuesta a estrés tras estimulación simpática (Bentley, 2002).

1.2.1. Hipotálamo.

En los peces, un conjunto de neuronas situadas en el área preóptica y en el núcleo tuberal lateral hipotalámico reciben e integran la información de múltiples entradas procedentes de los sistemas sensoriales, produciendo y liberando neuropéptidos de la familia del CRF (Flik *et al.*, 2006). En mamíferos, la síntesis y liberación de CRF se regula a través de neurotransmisores como la adrenalina, el GABA o la serotonina (Herman *et al.*, 2003); sin embargo, estas vías de regulación a nivel central aún no están bien caracterizadas en teleósteos. El CRF en algunos peces también puede tener un origen periférico, liberándose a la sangre a partir de la urófisis en la platija (Lu *et al.*, 2004) y del tejido cromafín de la región cefálica del riñón en la carpa común (Huisin *et al.*, 2007).

El **CRF** es un péptido de 41 aminoácidos (Esquema 1) con una estructura muy conservada a lo largo de la filogenia, mostrando una identidad de secuencia del 93% entre peces y humanos (Flik *et al.*, 2006):

Met-Lys-Leu-Asn-Phe-Leu-Val-Thr-Thr-Val-Ala-Leu-Leu-Val-Ala-Phe-Pro-Pro-Pro-Tyr-Glu-Cys-Arg-Ala-Ile-Glu-Ser-Ser-Ser-Asn-Gln-Pro-Ala-Ala-Asp-Pro-Asp-Gly-Glu-Arg-Gln-Ala-Pro-Pro-Val-Leu-Ala-Arg-Leu-Gly-Glu-Glu-Tyr-Phe-Ile-Arg-Leu-Gly-Asn-Arg-Asp-Gln-Asn-Pro-Leu-Arg-Ser-Pro-Ala-Asp-Ser-Phe-Pro-Glu-Thr-Ser-Gln-Tyr-Ser-Lys-Arg-Ala-Leu-Gln-Leu-Gln-Leu-Thr-Gln-Arg-Leu-Leu-Glu-Gly-Lys-Val-Gly-Asn-Ile-Gly-Arg-Leu-Asp-Gly-Asn-Tyr-Ala-Leu-Arg-Ala-Leu-Asp-Ser-Val-Glu-Arg-Glu-Arg-Arg-Ser-Glu-Glu-Pro-Pro-Ile-Ser-Leu-Asp-Leu-Thr-Phe-His-Leu-Leu-Arg-Glu-Val-Leu-Glu-Met-Ala-Arg-Ala-Glu-Gln-Met-Ala-Gln-Gln-Ala-His-Ser-Asn-Arg-Lys-Met-Met-Glu-Ile-Phe-Gly-Lys

Esquema 1. Secuencia de aminoácidos del precursor de CRF en el carpín (*Carassius auratus*) (Bernier *et al.*, 1999).

El CRF se transporta en plasma unido a la proteína **CRF-BP** (*CRF binding protein*). La CRF-BP se sintetiza en el área preóptica del hipotálamo, en una población celular diferente de la que sintetiza el CRF y su función es modular la disponibilidad de CRF activo y actuar como reserva del péptido (Huisin *et al.*, 2004; Flik *et al.*, 2006).

En el caso de los teleósteos, que carecen de sistema vascular portal hipofisario, las neuronas hipotalámicas productoras de CRF inervan directamente a las células corticotropas adenohipofisarias, donde estimulan la síntesis y secreción de ACTH (Huisin *et al.*, 2004; Flik *et al.*, 2006).

Las acciones del CRF y de los péptidos de su misma familia (urotensinas, urocortinas y sauvagina en vertebrados, y péptidos diuréticos en insectos; Lovejoy y Balment, 1999) están mediadas por al menos dos tipos de **receptores** acoplados a proteínas G (CRF-R1 y CRF-R2), cuya activación desencadena una cascada de segundos mensajeros vía AMPc/PKA (Kageyama *et al.*, 2006). Los receptores de CRF están ampliamente distribuidos en el sistema nervioso central y en tejidos periféricos. La activación del receptor CRF-R1 en la hipófisis inicia una cascada de señalización intracelular que conduce a un incremento en la biosíntesis y secreción de ACTH, por lo que se considera a este subtipo de receptor el principal implicado en las respuestas fisiológicas al estrés (Flik *et al.*, 2006). De forma excepcional, en el pez gato (*Ameiurus nebulosus*) se ha aislado un tercer receptor para CRF que se expresa en hipófisis y urófisis, con propiedades de unión a ligando similares a CRF-R1 e implicado en la secreción de proopiomelanocortina (POMC) (Arai *et al.*, 2001).

El CRF no sólo tiene una **función** hipofisiotrófica activadora del eje HPI, sino que también actúa como neurotransmisor y neuromodulador coordinando una variedad de funciones fisiológicas, algunas de ellas en respuesta a estrés (Flik *et al.*, 2006). Así, la administración intracerebroventricular (ICV) de CRF desempeña, entre otras, una potente acción anorexigénica (De Pedro *et al.*, 1993, 1995; Bernier, 2006) y estimula la actividad locomotora (Carpenter *et al.*, 2007; Clements y Schreck, 2007; Ojima e Iwata, 2010).

La urotensina I, péptido de la familia del CRF y ortólogo de las urocortinas de mamíferos, se expresa fundamentalmente en la urófisis, aunque también se han encontrado transcritos de la hormona en el hipotálamo (Lu *et al.*, 2004). La urotensina I se une al receptor CRF-R1 con idéntica afinidad que el CRF (Lovejoy y Balment, 1999) y, al igual que él, se ha sugerido que estaría implicada en la regulación de la función interrenal (Kelsall y Balment, 1998), además de intervenir en respuestas comportamentales, como la ingesta (desempeñando, al igual que el CRF, una acción anorexigénica) y la actividad locomotora (Lovejoy y Balment, 1999).

1.2.2. Hipófisis.

La estimulación por el CRF de los receptores CRF-R1 situados en las células corticotropas de la *pars distalis* rostral de la adenohipófisis activa la síntesis de ACTH y su liberación a la circulación. La ACTH es una hormona de 39 aminoácidos (Esquema 2) derivada del procesamiento proteolítico de la POMC (Millington, 2007; Takahashi *et al.*, 2009), que en su extremo amino-terminal en la hipófisis anterior origina β -lipotropina, además de ACTH, y en el lóbulo intermedio origina α -MSH, β -MSH, γ -MSH, CLIP (*corticotropin-like intermediate lobe peptide*) y β -endorfina (Castro y Morrison, 1997). El extremo amino-terminal de la ACTH (residuos 1-24) está muy conservado en los vertebrados, mientras que el extremo carboxilo-terminal es más variable (Costa *et al.*, 2004).

Ser-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys-Pro-Val-Gly-Lys-Lys-Arg-Arg-Pro-Val-Lys-Val-Pyr-
Pro-Asn-Gly-Ala-Glu-Asp-Glu-Ser-Ala-Gln-Ala-Phe-Pro-Leu-Glu-Phe

Esquema 2. Secuencia de aminoácidos de la molécula de ACTH humana.

Además del CRF, en el control de la **síntesis y secreción** de ACTH intervienen otros reguladores, de los cuales la arginina vasotocina es uno de los más importantes. También se ha descrito un efecto estimulador de la secreción de ACTH por otras moléculas, como la isotocina (IT), la hormona liberadora de tirotropina (TRH) y el neuropéptido Y (NPY) (Wendelaar Bonga, 1997), mientras que la hormona concentradora de melanóforos (MCH) inhibe su secreción (Barcellos *et al.*, 1999; Chandroo *et al.*, 2004). Además, en la regulación de la liberación de ACTH por el CRF parece importante la existencia de un ligero tono dopaminérgico inhibitorio, que de esta forma equilibra y controla la respuesta del eje HPI ante situaciones de estrés (Flik *et al.*, 2006).

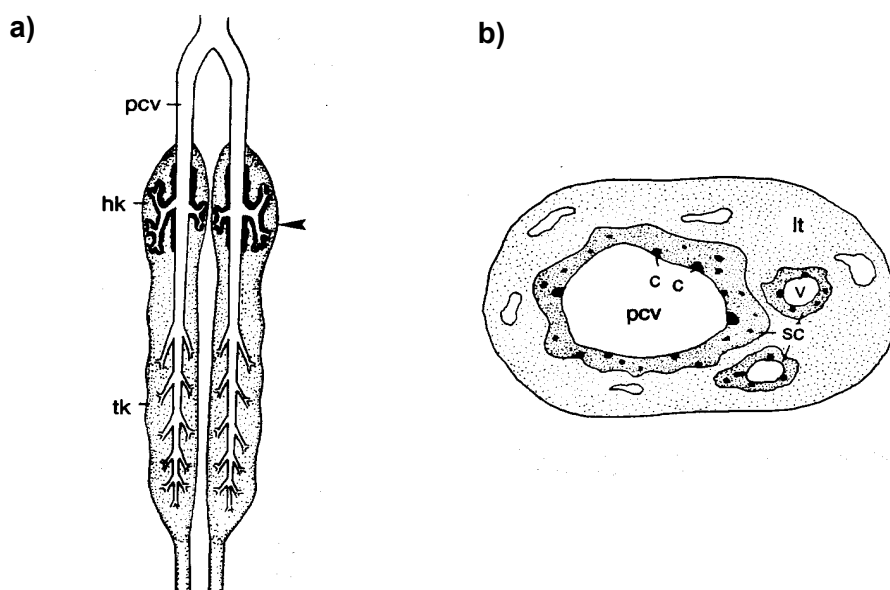
Tras su liberación, la ACTH se une a los **receptores** de melanocortina de tipo 2 (MC2R) situados en la membrana de las células esteroideogénicas interrenales. Se han

encontrado pequeñas cantidades de MC2R en otros órganos, como riñón, gónadas, hipotálamo o bazo (Metz *et al.*, 2005; Aluru y Vijayan, 2008). La ACTH es el único ligando del MC2R (Aluru y Vijayan, 2008; Veo *et al.*, 2011) y su activación desencadena una cascada de señalización intracelular vía AMPc/PKA, que regula la expresión génica y la actividad de enzimas esteroidogénicas implicadas en la síntesis de cortisol (Sewer y Waterman, 2003). En la activación del receptor MC2R intervienen proteínas accesorias de los receptores de melanocortinas (MRAPs), esenciales para el correcto plegamiento de MC2R y para su transporte a la superficie celular, así como para la unión a la ACTH y la posterior producción de AMPc (Agulleiro *et al.*, 2010; Roy *et al.*, 2012).

Se ha establecido un papel clave de la ACTH en el control de la secreción de cortisol y, por tanto, como regulador de las respuestas al estrés (Wendelaar Bonga, 1997; Mommsen *et al.*, 1999). Sin embargo, la capacidad de la ACTH para unirse a los distintos tipos de receptores de melanocortinas descubiertos hasta la fecha en peces le confiere múltiples propiedades en este grupo de vertebrados. Así, la ACTH está implicada, entre otras funciones, en la regulación de la pigmentación y en la secreción de catecolaminas por las células cromafines del tejido interrenal (Bernier *et al.*, 2009).

1.2.3. Tejido interrenal.

En los peces teleósteos, la glándula adrenal no forma una estructura compacta como en otros vertebrados, sino que sus células se encuentran agrupadas formando cordones distribuidos de forma dispersa a lo largo de las venas cardinales del riñón, embebidas en tejido hematopoyético, denominándose por esta razón glándula interrenal (Esquema 3). Este tejido se localiza principalmente en la región cefálica (apical) del riñón, generalmente en su superficie ventral (Bentley, 2002). Las células interrenales se diferencian en dos tipos: el **tejido cromafín**, productor y liberador de catecolaminas (adrenalina, A, y noradrenalina, NA) y el **tejido esteroidogénico**, encargado de producir y liberar esteroides adrenales. Las catecolaminas y los esteroides adrenales son mensajeros de las dos rutas principales por las que el sistema nervioso central regula la respuesta al estrés: el eje hipotálamo-tejido cromafín (también denominado eje simpático adrenal) y el eje hipotálamo-hipófisis-tejido esteroidogénico (Wendelaar Bonga, 1997).



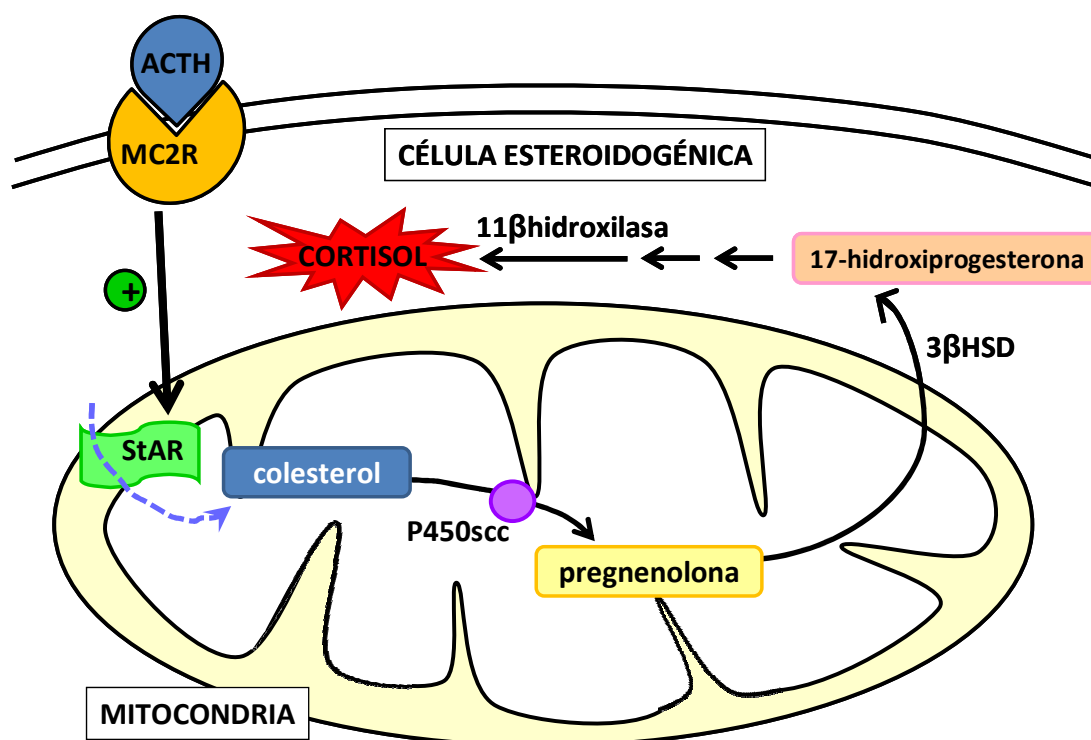
Esquema 3. a) Representación esquemática del riñón de los teleósteos mostrando la región cefálica (hk, *head kidney*) y el tronco (tk, *trunk kidney*). Las venas postcardinales (pcv) y sus ramificaciones se encuentran rodeadas por el tejido interrenal. **b)** Corte transversal de la región cefálica del riñón mostrando las células esteroidogénicas (sc) y los cordones de células cromafines (c) alrededor de la vena postcardinal (pcv) y pequeños vasos sanguíneos (v). It: tejido linfomieloide (Wenderlaar Bonga, 1997).

1.2.3.1. Tejido esteroidogénico: cortisol.

En todos los peces estudiados hasta la actualidad, el incremento de **cortisol** circulante es la principal señal indicadora de la activación del eje HPI en respuesta a los agentes estresantes. En algunas especies, las células esteroidogénicas pueden producir, además de cortisol, pequeñas cantidades de corticosterona y otros esteroides 18 hidroxilados.

El cortisol se origina a partir de los ésteres de colesterol circulantes que se encuentran unidos a las lipoproteínas plasmáticas. Una serie de receptores presentes en la membrana de las células esteroidogénicas introducen los ésteres de colesterol al citoplasma de la célula, donde una lipasa rompe el enlace éster, liberando el colesterol (Sewer y Waterman, 2007). La entrada del colesterol desde el citoplasma hasta la membrana mitocondrial interna a través del espacio intermembrana se considera el paso limitante de la esteroidogénesis, y se realiza gracias a un conjunto de proteínas, de las cuales la más importante es la proteína aguda reguladora de la esteroidogénesis (StAR, de sus siglas en inglés, *steroidogenic acute regulatory protein*) (Stocco, 2000; Sewer *et al.*, 2007). Clark y colaboradores (1994) caracterizaron un fragmento de ADN que codifica para esta proteína transportadora y demostraron posteriormente que la ACTH, al igual que otros factores de transcripción, inducen una síntesis rápida de StAR vía AMPc/PKA (Clark *et al.*, 1995; Stocco, 2001).

Actualmente se conoce la secuencia de StAR y se ha descrito su papel en la esteroidogénesis en múltiples especies de vertebrados, incluyendo algunos teleósteos (*Oncorhynchus mykiss*, Kusakabe *et al.*, 2002; *Anguilla japonica*, Li *et al.*, 2003; *Sparus aurata*, Castillo *et al.*, 2008). En la matriz mitocondrial, la enzima citocromo P450scc (desmolasa) escinde los seis carbonos terminales de la cadena lateral del colesterol, generando pregnenolona, que abandona la mitocondria y se transforma en 17-hidroxiprogesterona en el citoplasma por acción de la 3- β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3 β HSD). Posteriormente, una serie de hidroxilaciones adicionales dependientes de NADP conducen a la formación de los metabolitos intermediarios que rinden finalmente los diferentes esteroides adrenales característicos de cada especie. En concreto, la enzima 11- β -hidroxilasa es la responsable de catalizar la última reacción de la ruta biosintética del cortisol (Hadley, 1997; Payne y Hales, 2004; Sewer *et al.*, 2007; Alsop y Vijayan, 2009) (Esquema 4).



Esquema 4. Síntesis de cortisol en una célula esteroidogénica. ACTH: hormona adrenocorticotropa; MC2R: receptor de melanocortinas tipo 2; StAR: proteína aguda reguladora de la esteroidogénesis; P450scc: desmolasa; 3 β HSD: 3- β -hidroxiesteroide deshidrogenasa.

El incremento de los niveles de cortisol en ocasiones no está acompañado de un aumento en los niveles de ACTH, lo que sugiere la existencia de otros **mecanismos reguladores** de la esteroidogénesis adrenal (Bornstein y Chrousos, 1999; Bornstein *et al.*, 2008). Entre ellos, las fibras colinérgicas preganglionares que

inervan la glándula podrían estimular las células interrenales directamente, liberando cortisol (Arends *et al.*, 1999). Por otro lado, se ha sugerido una estrecha comunicación paracrina multidireccional entre las células esteroideogénicas y cromafines del tejido interrenal y el sistema inmune que las rodea (Gfell *et al.*, 1997; Flik *et al.*, 2006). Asimismo, en la regulación de la producción de cortisol intervienen también otras hormonas, tanto estimuladoras (hormona de crecimiento, angiotensina II, urotensinas I y II, tiroxina, arginina vasotocina, péptido natriurético auricular) como inhibidoras (α -MSH y β -endorfina) (Wendelaar Bonga, 1997; Mommsen *et al.*, 1999).

En los peces, los niveles circulantes de cortisol aumentan unos minutos después de la activación del eje HPI en respuesta a un estrés agudo y recuperan los niveles basales entre una y dos horas después (Ruane *et al.*, 2002), si bien se han descrito excepciones a este perfil general (Barcellos *et al.*, 2005; Van der Salm *et al.*, 2006; Davis y Small, 2006; Schjolden *et al.*, 2006; Cnaani y McLean, 2009). Cuando el agente estresante perdura de forma crónica, el cortisol puede mantenerse elevado, aunque con valores inferiores a los máximos alcanzados inmediatamente después de la exposición inicial al estrés. La magnitud y duración del incremento de cortisol depende de la naturaleza, intensidad y duración del agente estresante, así como de la historia previa del animal (Aluru y Vijayan, 2009), y de otros factores como la temperatura del agua, la presencia de contaminantes, la especie, etc. (Barton *et al.*, 2002; Davis y Small, 2006). En ocasiones, se pueden observar niveles elevados de cortisol no necesariamente asociados a la exposición a situaciones de estrés (Greenberg *et al.*, 2002).

Al igual que ocurre con todas las hormonas esteroides, el cortisol es muy poco soluble en agua, por lo que su **transporte** en sangre se realiza por medio de proteínas plasmáticas (principalmente la transcortina o globulina fijadora de corticosteroides, y en menor proporción una α -2globulina), a las que el cortisol se encuentra unido reversiblemente. El cortisol unido a proteínas proporciona un dispositivo de reserva de corticosteroides que, al disociarse rápidamente de sus proteínas transportadoras, queda disponible como cortisol libre (Hadley, 1997). Esta fracción libre (aproximadamente el 6% del cortisol total), representa la hormona disponible para actuar en los tejidos diana.

El cortisol se une a **receptores** intracelulares pertenecientes a la superfamilia de receptores nucleares, que actúan como factores de transcripción dependientes de ligando. Estos receptores se encuentran en forma de estructuras heteroméricas formadas por un par de proteínas fijadoras de esteroides asociadas a una proteína de choque térmico (HSP, *heat shock protein*). La entrada de cortisol a las células puede producirse por un mecanismo de difusión pasiva, si bien algunos estudios indican que

puede estar implicada una proteína transportadora de baja afinidad (Vijayan *et al.*, 1997). Cuando la hormona se une al receptor, se produce la disociación de sus subunidades y su activación. Los complejos hormona-receptor activados se translocan al núcleo, donde se asocian en forma de dímeros con elementos de respuesta hormonal en el ADN, como los factores de transcripción NF- κ B (factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas) y STAT5 (proteína transductora de señal y activadora de la transcripción), a través de los cuales modulan la transcripción de múltiples genes (Nader *et al.*, 2010).

Los peces teleósteos carecen de una producción significativa del mineralocorticoide aldosterona. Por ello, en estos vertebrados el cortisol muestra dos acciones, gluco- y mineralocorticoide (Prunet *et al.*, 2006), pudiendo unirse a dos clases de **receptores**: tipo I (receptor de mineralocorticoides, MR) y tipo II (receptor de glucocorticoides, GR). Además, en la mayoría de los teleósteos, a diferencia del resto de vertebrados, existen al menos dos isoformas génicas del GR (GR1 y GR2), que probablemente surgieron a partir de la duplicación genómica completa que ocurrió en este grupo de vertebrados (Jaillon *et al.*, 2004), y que podrían dotar a los peces de una mayor plasticidad en la respuesta a agentes estresantes (Bury y Sturm, 2007). Los dos tipos de GR muestran distintas afinidades por el cortisol dependiendo de la especie y de la evolución temporal de la respuesta, siendo GR1 la isoforma más sensible, activada por niveles bajos de cortisol propios de peces no estresados, mientras que los niveles elevados de cortisol inducidos por exposición a estrés activarían transcripcionalmente ambas isoformas de los GR, siendo GR2 quien media las patologías asociadas al estrés por su efecto inmunosupresor (Sturm *et al.*, 2005; Prunet *et al.*, 2006; Bury y Sturm, 2007). El MR de peces, además de cortisol, también puede unir 11-desoxicorticosterona, un mineralocorticoide circulante que aparece en algunos peces, aunque en concentraciones muy inferiores a las del cortisol (Sturm *et al.*, 2005).

Ambos, GR y MR, muestran una amplia distribución tanto en localizaciones centrales como en tejidos periféricos de los peces. Así, los GR se expresan en el cerebro completo y la pineal de tilapia (*Oreochromis mossambicus*) (Benyassi *et al.*, 2001; Nikaido *et al.*, 2010) y en el bulbo olfatorio, telencéfalo, diencéfalo, techo óptico y células gonadotropas de la hipófisis de la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) (Teitsma *et al.*, 1998). En la carpa común (*Cyprinus carpio*), ambos GR y MR están presentes en el palio telencefálico, en células productoras de CRF del área preóptica y en células somatotropas y corticotropas de la hipófisis (Stolte *et al.*, 2008). En órganos periféricos, existen GR en el riñón, bazo, testículo, branquias, intestino e hígado de

tilapia (Nikaido *et al.*, 2010), siendo estos tres últimos los principales órganos diana del cortisol en los peces (Wendelaar Bonga, 1997).

Los efectos de los glucocorticoides que generan cambios en la expresión génica necesitan un cierto tiempo para producirse. Sin embargo, parte de los efectos del cortisol se producen de forma muy rápida y desaparecen también rápidamente, por lo que parecen estar mediados por mecanismos no genómicos, debidos probablemente a la unión del cortisol a receptores de membrana (Tasker *et al.*, 2006). Se ha sugerido que ambas respuestas, genómicas y no genómicas, actuarían conjuntamente, de forma que las respuestas rápidas generadas por los mecanismos no genómicos irían seguidas de las respuestas más persistentes mediadas por acciones genómicas (Haller *et al.*, 2008).

Debido a su capacidad para unirse tanto a GR como a MR, el cortisol tiene un amplio espectro de **acciones** en los peces, pudiendo actuar como mineralocorticoide, regulando el balance osmótico tanto en peces de agua dulce como de agua salada, y como glucocorticoide, interviniendo en el metabolismo de glúcidos, lípidos y proteínas. En este sentido, el aumento de cortisol circulante suele ir acompañado frecuentemente de una hiperglucemia (principalmente por estimulación de la gluconeogénesis) y de un aumento de los ácidos grasos circulantes (por estimulación de la lipólisis, reduciendo las reservas de lípidos hepáticos y musculares), ambos parámetros indicadores de respuesta secundaria al estrés (Wendelaar Bonga, 1997).

El cortisol, como hormona resultante de la estimulación del eje HPI, podría actuar como regulador de la ingesta tras la exposición a una situación de estrés. De hecho, el estrés es una de las causas de reducción de la ingesta y de pérdida de comportamiento alimentario, siendo la intensidad de este efecto dependiente de la severidad del estrés y del estado fisiológico previo del animal (Wendelaar Bonga, 1997; Bernier, 2006). Bernier y colaboradores (2004) demostraron que el efecto de la administración crónica de cortisol sobre la ingesta en el carpín es dosis-dependiente, con una acción orexigénica a dosis bajas, y anorexigénica a dosis mayores, interaccionando para ello con otros péptidos neurales reguladores de la ingesta, como NPY o CRF. Un estudio anterior también realizado en el carpín no encuentra efecto del tratamiento agudo con esta hormona sobre la ingesta (De Pedro *et al.*, 1997). Otros trabajos han implicado a otros neuropéptidos y hormonas, como la serotonina (De Pedro *et al.*, 1998b; Øverli *et al.*, 1998), la leptina (Gorissen *et al.*, 2012) o la ghrelina (Pankhurst *et al.*, 2008) en la regulación de la ingesta en situaciones de estrés, lo que evidencia que se trata de un proceso complejo en el que necesariamente intervienen múltiples elementos (Bernier y Peter, 2001a; Conde-Sieira *et al.*, 2010a, 2010b, 2010c).

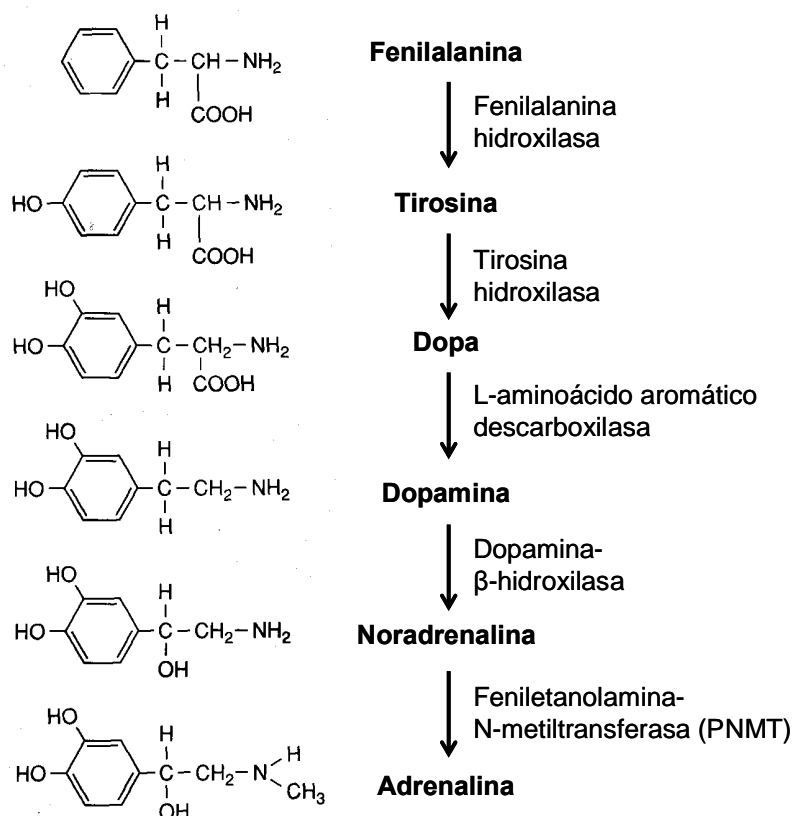
El cortisol, tras generar la respuesta a la situación de estrés que activó el eje, recupera sus niveles basales a través de un mecanismo de retroalimentación negativa, inhibiendo la expresión génica y la liberación de CRF y ACTH a nivel hipotálamo e hipofisario, y de su propia síntesis en el tejido adrenal (Osterlund y Spencer, 2011; Weiser *et al.*, 2011). En este sentido, se ha descrito un elemento de unión a glucocorticoides en el promotor de CRF (Malkoski y Dorin, 1999) y de POMC (Drouin *et al.*, 1989) de varias especies de mamíferos. En peces, la existencia de ARNm de GR o de la propia proteína, así como su elevada densidad en el núcleo preóptico y otras regiones encefálicas de varias especies apoyaría una retroalimentación llevada a cabo por el cortisol y mediada por estos receptores (Teitsma *et al.*, 1998; Pepels *et al.*, 2004; Stolte *et al.*, 2008). El cortisol también puede regular su propia producción a nivel interrenal, reduciendo el número de MC2R en las células esteroideogénicas (Wendelaar Bonga, 1997).

1.2.3.2. Tejido cromafín: catecolaminas.

El tejido cromafín de la glándula interrenal es el encargado de la producción de catecolaminas. La ruta de biosíntesis de las catecolaminas parece ser idéntica en el sistema nervioso central, en las neuronas simpáticas postganglionares y en el tejido cromafín. Sin embargo, el número de etapas de la ruta depende del producto definitivo que se secrete: NA, A o dopamina (DA); en el caso del tejido cromafín se libera principalmente A, aunque también pequeñas cantidades de NA. En el interior de la célula cromafín, la tirosina es convertida en L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA) por la enzima tirosina hidroxilasa, limitante de la biosíntesis de las catecolaminas. En el siguiente paso la L-DOPA es descarboxilada a DA por la L-aminoácido aromático descarboxilasa. Dentro de la vesícula cromafín, la DA es hidroxilada por la dopamina- β -hidroxilasa, generando NA, que a su vez producirá A fuera del gránulo por acción de la feniletanolamina-N-metiltransferasa, enzima presente únicamente en las células que sintetizan A (Esquema 5) (Hadley, 1997; Bentley, 2002).

La **liberación** de catecolaminas tras la exposición a una situación de estrés es estimulada principalmente por fibras colinérgicas preganglionares del sistema nervioso simpático. Sin embargo, el hecho de que tras la sección de esta inervación no se anule totalmente la secreción de catecolaminas en respuesta al estrés indica que ha de existir una estimulación no colinérgica de la liberación y que parece estar mediada tanto por factores endocrinos (cortisol) como no endocrinos (hipoxia, hipercapnia, hipercalcemia) (Randall y Perry, 1992). Por tanto, se acepta que la liberación de

catecolaminas en los teleósteos está sometida a un complejo control endocrino y ambiental (Wendelaar Bonga, 1997).

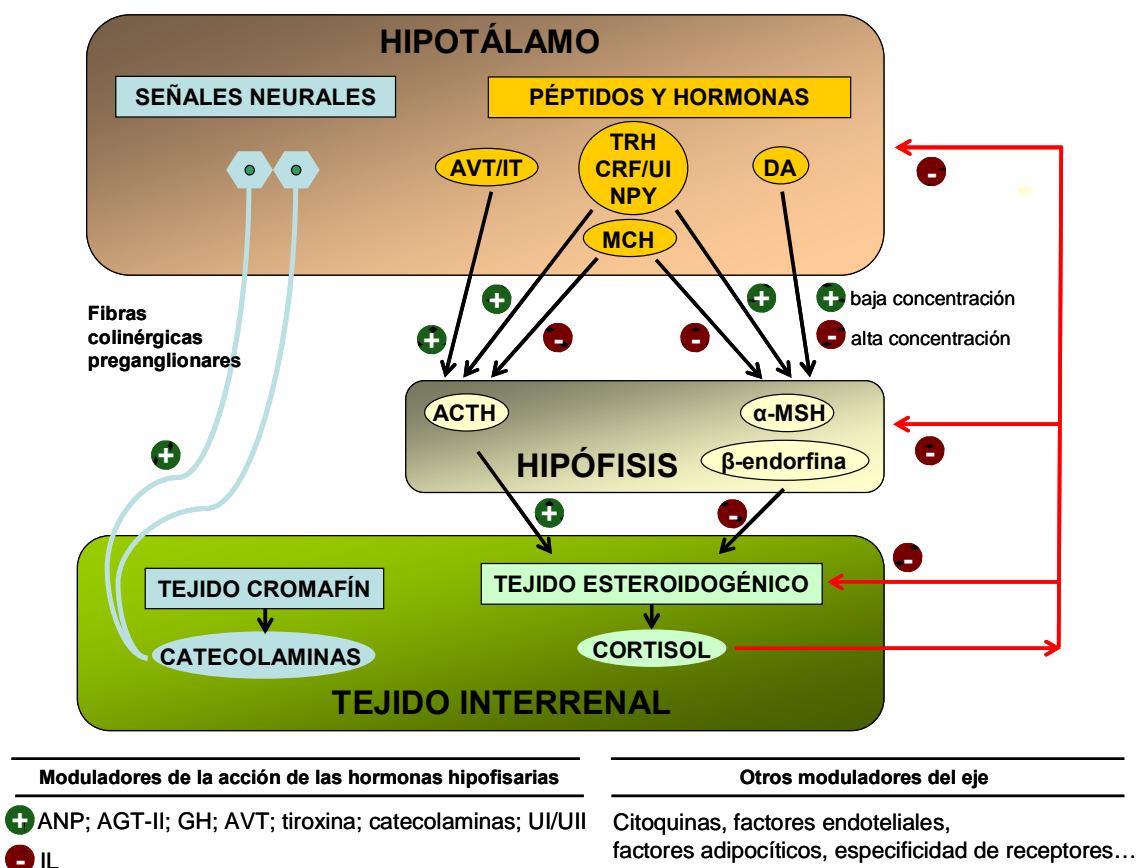


Esquema 5. Ruta de biosíntesis de las catecolaminas (Hadley, 1997).

Como respuesta a un agente estresante agudo se observa un rápido aumento (1-3 min) en los niveles de catecolaminas circulantes, aumentando principalmente la A en teleósteos. Este aumento desaparece también rápidamente como consecuencia de la corta vida media de las catecolaminas en sangre (menor a 10 min). Ante la exposición crónica al agente estresante, el aumento de los niveles circulantes de catecolaminas puede prolongarse durante horas o días (Wendelaar Bonga, 1997).

Las catecolaminas realizan **funciones** muy variadas en los peces, todas ellas mediadas por dos tipos de receptores adrenérgicos, α y β , y sus múltiples subtipos (α_1 - α_2 , y sus subtipos, y β_1 - β_4), pertenecientes a la familia de receptores acoplados a proteínas G (Gomperts *et al.*, 2002). Como respuesta al estrés caben destacar sus efectos respiratorios y cardiovasculares (mayor frecuencia cardíaca, tasa ventilatoria y flujo sanguíneo branquial, aumento del hematocrito) y sus efectos metabólicos (aumento de la glucemia, movilización de ácidos grasos) (Sheridan, 1994; Wendelaar Bonga, 1997).

En el Esquema 6 se muestra un resumen de los elementos que constituyen el eje HPI y los mecanismos neuroendocrinos que regulan su funcionalidad:



Esquema 6. Principales elementos del eje hipotálamo-hipófisis-interrenal en los peces y su control por señales neurales y reguladores neuroendocrinos. AVT: arginina vasotocina, IT: isotocina, TRH: hormona liberadora de tirotropina, CRF: factor liberador de corticotropina, UI: urotensina I, NPY: neuropéptido Y, MCH: hormona concentradora de melanóforos, DA: dopamina, ACTH: adrenocorticotropina, α-MSH: hormona estimuladora de melanóforos tipo α, ANP: péptido natriurético auricular, AGT-II: angiotensina II, GH: hormona de crecimiento, UII: urotensina II, IL: interleukina.

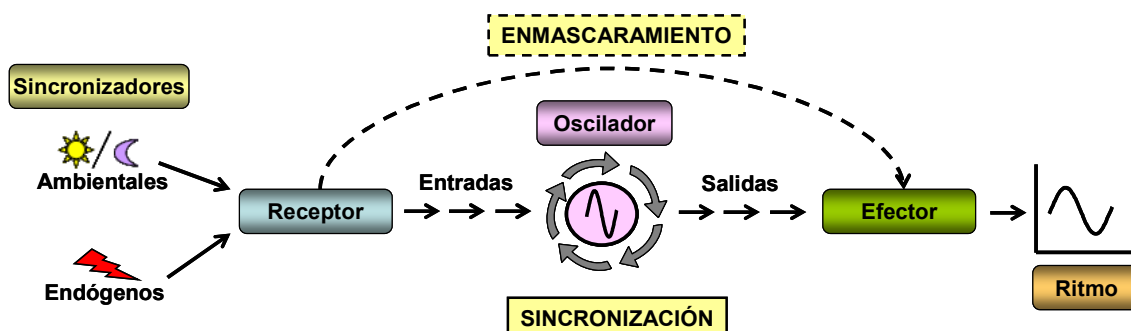
2. SISTEMA CIRCADIANO Y EJE HIPOTÁLAMO-HIPÓFISIS-ADRENAL.

2.1. ORGANIZACIÓN CIRCADIANA EN LOS PECES.

La existencia de ritmos circadianos se produce como respuesta adaptativa a los cambios cíclicos ambientales, pero no como una respuesta pasiva, sino como un mecanismo de anticipación a los mismos. Podemos considerar al **sistema circadiano** como el conjunto de elementos que asegura una organización temporal funcional en el organismo, incluyendo desde la entrada de información del exterior hasta las distintas vías de salida y, necesariamente, los sistemas de relojes u osciladores o marcapasos internos que permiten “medir el tiempo” (Pando *et al.*, 2001).

El modelo de organización circadiana aceptado en la actualidad aparece representado en el Esquema 7 y consta de:

1. Las entradas (factores ambientales externos y señales endógenas) que actúan como sincronizadores o *zeitgebers* (“dadores de tiempo”) de los osciladores.
2. Los osciladores, que generan *per se* la oscilación.
3. Los ritmos biológicos de salida de los relojes.

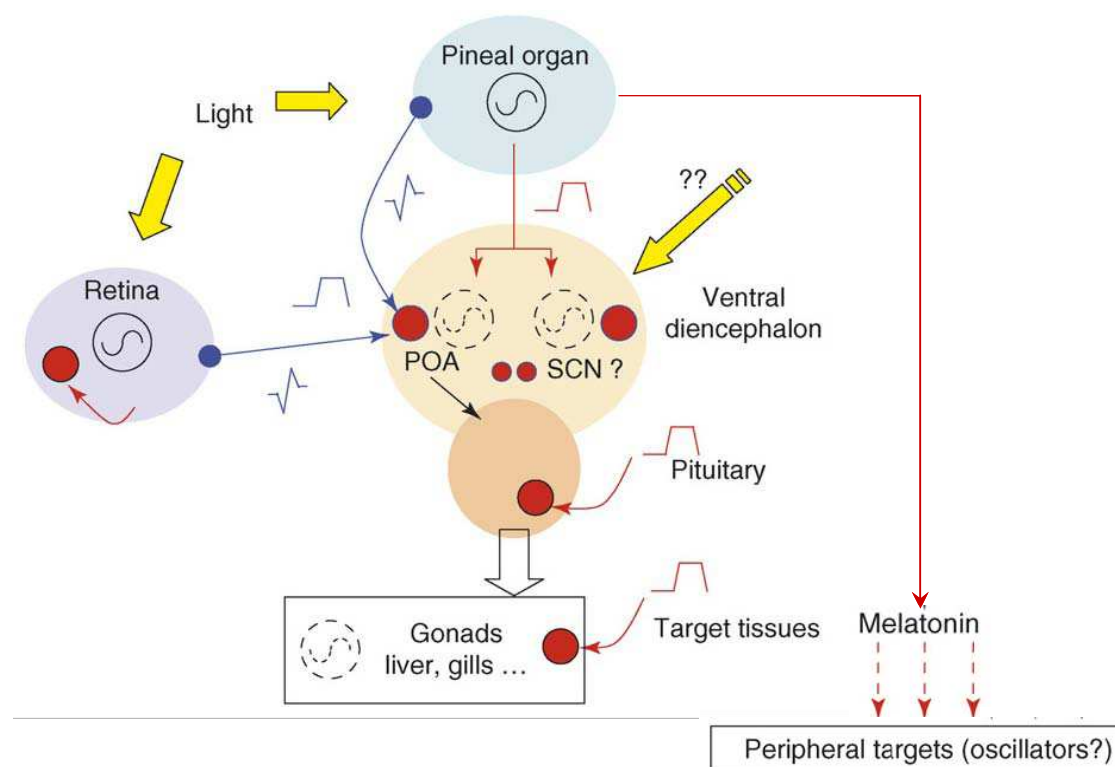


Esquema 7. Principales elementos que intervienen en la generación y regulación general de un ritmo circadiano (modificado de Cambras Riu, 2006).

El carácter endógeno de un ritmo implica la existencia de un reloj interno con un periodo característico que se mantiene invariable en condiciones denominadas de curso libre (*free-running*), es decir, en ausencia de estímulos (Aschoff, 1981). Los estímulos rítmicos pueden actuar como *zeitgebers*, modificando el funcionamiento del reloj endógeno de manera que su periodo se iguale con el periodo del estímulo (sincronización o encarrilamiento) (Cahill y Besharse, 1991). De la misma manera, algunos de dichos estímulos rítmicos pueden actuar directamente sobre el sistema efector y no sobre el oscilador, generándose un ritmo observable pero no sincronizado que, a diferencia de la sincronización, no permanece al retirar el estímulo que lo originó. Este proceso se denomina enmascaramiento (Cambras Riu, 2006).

En la organización circadiana de los **peces** interviene un sistema multioscilar formado por una serie de relojes acoplados (Esquema 8). En este sistema, el fotoperiodo es el *zeitgeber* más importante, considerando que las estructuras sincronizadas por él forman parte del denominado LEO (*Light Entrainable Oscillator*). La información luminosa se percibe principalmente a través de dos estructuras fotosensibles, la retina y el órgano pineal (Falcón *et al.*, 2010), si bien existen evidencias morfofuncionales que indican la existencia de otras estructuras fotosensibles en ciertos núcleos hipotalámicos, cuya funcionalidad aún permanece sin resolver (Menaker *et al.*, 1997; Peirson *et al.*, 2006). Aunque el patrón de proyecciones desde la retina y el órgano pineal muestra una cierta variabilidad en las distintas especies de teleósteos estudiadas, muchas de las regiones encefálicas que reciben terminaciones pinealofugales también se corresponden con núcleos retinoceptores (Ekström y Meissl, 1997; Mandado *et al.*, 2001). Además de la información nerviosa

conducida por las neuronas, los fotorreceptores pineales y retinianos de los peces producen y liberan un mensaje endocrino de importancia clave para el organismo, la melatonina (MEL) (Falcón *et al.*, 2010), de la que hablaremos más adelante.



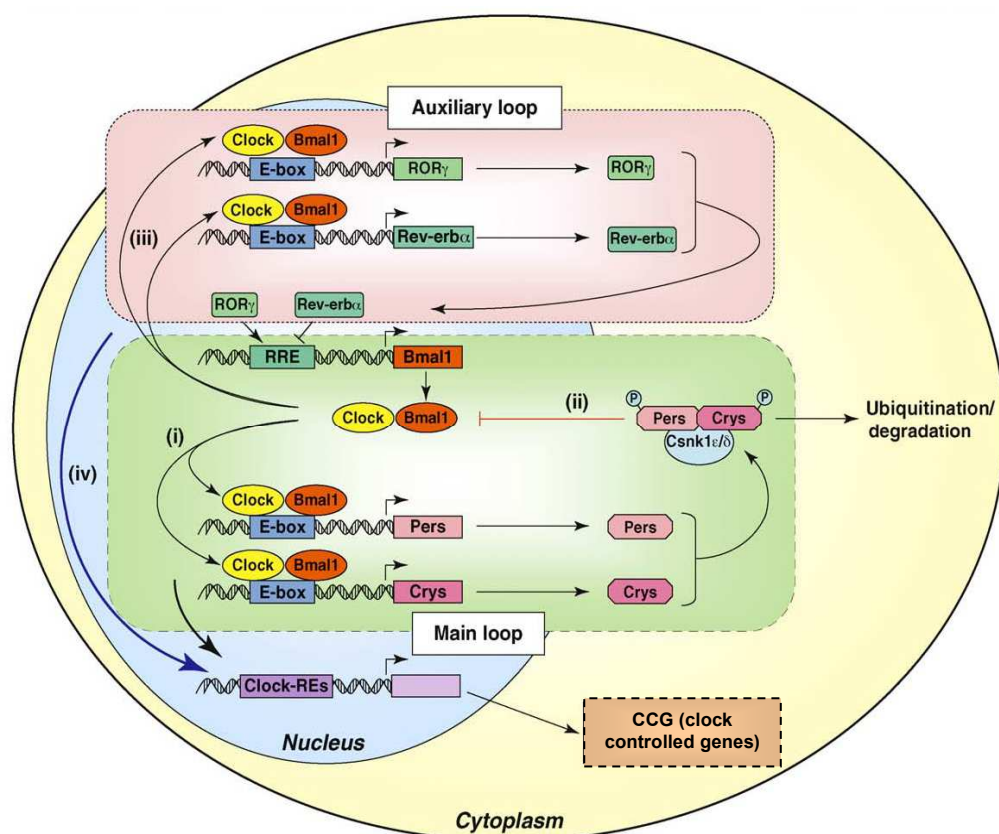
Esquema 8. Regulación fotoneuroendocrina en los peces. En respuesta a la información fotoperiódica, retina y pineal elaboran dos tipos de información rítmica. Una información neural (flechas azules) que, a través de los tractos retinohipotalámico y pineal respectivamente, alcanza el diencéfalo ventral, y una información endocrina, en forma de melatonina (flechas rojas), que actúa sobre receptores específicos (círculos rojos) pudiendo contribuir a la sincronización de los osciladores circadianos, y a la regulación funcional hipotalámica e hipofisaria (modificado de Falcón *et al.*, 2007).

Además del fotoperiodo, otros *zeitgebers* también intervienen en la regulación de la ritmicidad circadiana, siendo la temperatura ambiental (Rensing y Ruoff, 2002; López-Olmeda *et al.*, 2006b) y el horario de alimentación (Madrid *et al.*, 2001; Vera *et al.*, 2007; Feliciano *et al.*, 2011) dos de los más estudiados. La existencia de una actividad anticipatoria al alimento (FAA) es una de las evidencias de la existencia de un oscilador sincronizable por el alimento (*Food Entrainable Oscillator*, FEO).

Entre las potenciales vías de salida del sistema circadiano de los peces, algunas de las más estudiadas son la actividad locomotora y los niveles de hormonas circulantes (MEL, cortisol, etc.), si bien los ritmos metabólicos están adquiriendo gran relevancia, particularmente la glucosa, el lactato, los triglicéridos y el colesterol plasmáticos (Cerdá-Reverter *et al.*, 1998; De Pedro *et al.*, 2005; Polakof *et al.*, 2007; Conde-Sieira *et al.*, 2012b).

2.1.1. **Mecanismo molecular de los relojes circadianos.**

El mecanismo molecular de los relojes circadianos muestra un elevado grado de conservación a lo largo de la filogenia, compartiendo un funcionamiento básico idéntico desde los invertebrados hasta los humanos (Dunlap, 1999). Los relojes circadianos basan su funcionamiento en un conjunto de genes denominados **genes reloj**, también muy conservados en la filogenia, incluyendo organismos unicelulares, plantas, invertebrados y vertebrados. El mecanismo de funcionamiento de los genes reloj consiste en un sistema de autorregulación formado por bucles de retroalimentación entre los procesos de transcripción y traducción de dichos genes reloj y sus productos proteicos, con un periodo aproximado de alrededor de 24 h, por lo que se consideran verdaderos relojes circadianos (Panda *et al.*, 2002). Las proteínas codificadas por los genes reloj funcionan como factores de transcripción y pueden actuar como reguladores positivos o negativos. Los elementos reguladores positivos poseen un dominio básico hélice-lazo-hélice y un dominio PAS (bHLH-PAS), siendo *bmal1* (*brain-muscle-arnt-like protein1*), *clock* (*circadian locomotor output cycle kaput*), y *npas2* (*neuronal PAS domain protein 2*) algunos de los identificados en la actualidad. Los productos proteicos de estos genes heterodimerizan y se unen a secuencias reguladoras denominadas *E-box* (CACGTG) en los promotores de los genes que codifican para los reguladores negativos, es decir, las proteínas PERIOD (PER) y CRIPTOCROMO (CRY). Existen otras secuencias *E-box* no clásicas (CANNTG) que también pueden unir *clock* y *bmal1* (Leclerc y Boockfor, 2005). Los heterodímeros BMAL1/CLOCK o BMAL1/NPAS2 activan la transcripción génica de *per* y *cry*. A su vez, en un bucle de retroalimentación negativa, las proteínas PER y CRY se translocan al citoplasma, donde PER se fosforila por una serie de caseína kinasas. Los complejos resultantes pasan nuevamente al núcleo, donde se acumulan alcanzando un pico máximo al final de la fase diurna del fotociclo circadiano, e inhiben su propia expresión génica a través de su acción sobre los heterodímeros BMAL1/CLOCK. En consecuencia, los transcritos de *per* y *cry* y sus productos proteicos disminuyen, con lo que se libera la represión del dímero BMAL1/CLOCK, permitiendo que el ciclo se inicie de nuevo (Gallego y Virshup, 2007). Este bucle de retroalimentación negativa, que genera un ritmo de las proteínas PER y CRY, se considera el **mecanismo central** del reloj biológico circadiano (Esquema 9). Las modificaciones post-traduccionales de PER y CRY retrasan estas oscilaciones, generando de esta forma ritmos de duración próxima a 24 horas (Ko y Takahashi, 2006; Gallego y Virshup, 2007).



Esquema 9. Funcionamiento de los relojes circadianos. (i) El heterodímero CLOCK/BMAL1 se une a elementos *E-box* estimulando la expresión de factores de transcripción esenciales (*pers* y *crys*) que, a su vez (ii) reprimen la transcripción del heterodímero *clock/bmal1* a través de la formación de complejos y la posterior fosforilación por *Csnk1ε/δ*, inhibiendo su unión a los *E-box* de sus propios promotores. (iii) El heterodímero CLOCK/BMAL1 también estimula la expresión de otras proteínas relacionadas, como REV-ERBα y RORγ, creando un bucle auxiliar que ayuda a estabilizar el bucle regulador principal. (iv) Estos factores de transcripción controlan múltiples genes sensibles al reloj denominados CCG (*clock controlled genes*) implicados en múltiples actividades biológicas. *crys*: criptocromos, *pers*: *periods*, *Csnk1ε/δ*: caseína quinasa 1ε/δ (Nader *et al.*, 2010).

La estabilidad y precisión de este ciclo oscilador se logra gracias a otros bucles de retroalimentación auxiliares que interactúan con el bucle central. De estos bucles auxiliares, uno de los más estudiados implica a los receptores nucleares huérfanos relacionados con el ácido retinoico, del tipo REV-ERBα y RORγ, codificados por genes que también llevan secuencias *E-box* y que se expresan en forma rítmica en fase con *per* y *cry*. Es decir, su transcripción también está regulada por el heterodímero BMAL1/CLOCK, por lo que se acumulan durante la fase luminosa del ciclo circadiano. RORγ actúa a través de secuencias reguladoras RORE (elemento de respuesta al receptor huérfano relacionado con el ácido retinoico) situadas en el promotor de *bmal1*, activando su transcripción, mientras que la proteína REV-ERBα, que se une a estos elementos RORE tras un cierto retraso, inhibe la transcripción de *bmal1*. La desaparición de REV-ERBα durante la noche circadiana libera esta inhibición,

regenerándose de este modo el pico de expresión de *bmal1* (coincidiendo con el descenso de la retroalimentación negativa), en antifase con el pico diurno de expresión de los elementos negativos, *per* y *cry* (Iuvone *et al.*, 2005; Hastings *et al.*, 2008a).

La salida molecular de estos bucles oscilatorios se produce en forma de expresión rítmica de **genes controlados por el reloj** (CCG, del inglés *clock-controlled genes*), la mayoría de los cuales incluyen secuencias *E-box* o RORE en sus promotores, siendo por tanto, sensibles a la inhibición cíclica producida por CLOCK, BMAL1 y REV-ERB α . Entre ellos podemos encontrar múltiples genes con un fuerte carácter rítmico endógeno y regulación circadiana: canales iónicos, algunos péptidos y enzimas como la arilalquilamina N-acetiltransferasa (AANAT), limitante de la ruta biosintética de la MEL (Iuvone *et al.*, 2005; Hastings *et al.*, 2008b; Velarde *et al.*, 2010).

La primera evidencia de un ritmo de genes reloj en los **peces** fue mostrada por Whitmore y colaboradores (1998), quienes clonaron el gen *clock* en el pez cebra y demostraron variaciones en el ojo, pineal, corazón y riñón de esta especie en condiciones de oscuridad constante. Una de las diferencias más importantes en los peces respecto a los mamíferos es la identificación en estos vertebrados de varias copias de estos genes reloj, consecuencia de las duplicaciones genómicas ocurridas al inicio del linaje de los teleósteos hace 350 millones de años (Jaillon *et al.*, 2004; Vatine *et al.*, 2011). Actualmente se conocen las secuencias de los genes reloj en varias especies de teleósteos, habiéndose descrito ritmos de expresión asociados al ciclo luz/oscuridad en tejidos centrales del pez conejo (*Siganus guttatus*; Park *et al.*, 2007), el salmón atlántico (Davie *et al.*, 2009), el carpín (Velarde *et al.*, 2009a; Feliciano *et al.*, 2011), el pez cebra (López-Olmeda *et al.*, 2010), la lubina (Sánchez *et al.*, 2010; Del Pozo *et al.*, 2012), la trucha arco iris (López-Patiño *et al.*, 2011) y el lenguado (Martín-Robles *et al.*, 2011), y en tejidos periféricos del pez cebra (Whitmore *et al.*, 1998; Kaneko *et al.*, 2006; López-Olmeda *et al.*, 2010), el carpín (Velarde *et al.*, 2009a; Feliciano *et al.*, 2011; Nisembaum *et al.*, 2012), el salmón (Huang *et al.*, 2010) y la lubina (Sánchez *et al.*, 2010), y en larvas de pez cebra (Pando *et al.*, 2001).

2.2. RITMICIDAD EN EL EJE HIPOTÁLAMO-HIPÓFISIS-ADRENAL.

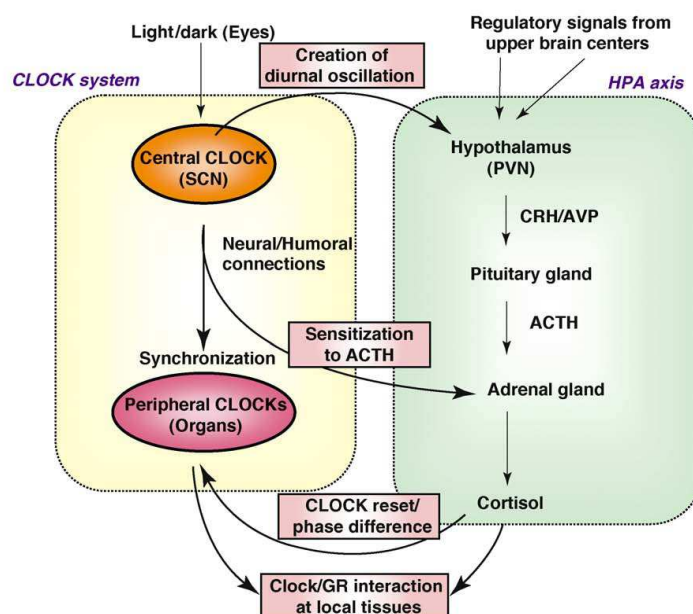
En la actualidad existe muy poca información en relación con la ritmicidad del eje HPI en teleósteos, por lo que se analiza este aspecto a partir de los numerosos resultados publicados en mamíferos. El eje HPA, además de desempeñar importantes acciones directas sobre múltiples sistemas del organismo, generalmente relacionadas con la respuesta al estrés, constituye un elemento clave en el funcionamiento del sistema circadiano. Se ha demostrado la existencia de ritmos en muchos componentes

del eje, particularmente de los corticosteroides adrenales, la ACTH hipofisaria y la CRF hipotalámica. La secreción de **corticosteroides** muestra una pronunciada regulación temporal, con una ritmicidad circadiana superpuesta a una ritmicidad ultradiana pulsátil (Lightman *et al.*, 2008; Walker *et al.*, 2010; Spiga *et al.*, 2011). Este patrón secretor pulsátil superpuesto al ritmo circadiano dificulta considerablemente el estudio de los patrones rítmicos diarios justificando, al menos en parte, los resultados contradictorios publicados en relación con parámetros circadianos de ritmicidad del eje HPA en distintos vertebrados. De forma general se observa un pico circadiano de liberación de corticosteroides al inicio de la fase activa del animal, produciéndose al inicio de la mañana en mamíferos diurnos y al inicio de la noche en los nocturnos, y un periodo de “reposo” diario de la adrenal, manteniendo pulsos de pequeña amplitud, durante el anochecer y en las primeras horas de la noche en mamíferos diurnos (Haus, 2007). La frecuencia de los pulsos circadianos es de 1-2 pulsos/hora (Haus, 2007; Lightman *et al.*, 2008; Dickmeis y Foulkes, 2011). Experimentos *in vitro* han sugerido que los pulsos circadianos podrían deberse a un retraso en la llegada de la ACTH a la adrenal y a la retroalimentación de los glucocorticoides sobre la ACTH (Walker *et al.*, 2010). La **ACTH** también exhibe ritmos diarios similares con pulsatilidad superpuesta, aunque menos robustos y de menor amplitud que los observados para los corticosteroides (Dallman *et al.*, 1978; Chrousos, 1998; Orth y Kovacs, 1998; Engeland y Arnhold, 2005; Haus, 2007). La síntesis de **CRF** también parece estar bajo control circadiano, mostrando variaciones diarias de su expresión génica en los mamíferos (Watts *et al.*, 2004; Haus, 2007). Aunque en principio cabría pensar en una relación directa entre los ritmos de CRF, ACTH y corticosteroides, esta correlación no parece estar muy clara, ya que se han descrito desacoplamientos funcionales entre la ritmicidad mostrada por los distintos elementos del eje HPA (Bornstein *et al.*, 2008). Además, en roedores, también se ha sugerido la existencia de ritmos diarios en la sensibilidad de las diferentes dianas endocrinas del propio eje (núcleos hipotalámicos, células hipofisarias y la propia adrenal), y particularmente en la sensibilidad de la adrenal a la estimulación por ACTH (Ulrich-Lai *et al.*, 2006; Haus, 2007).

En mamíferos, varios estudios han demostrado la importancia del ciclo luz/oscuridad en los ritmos diarios de secreción de corticosteroides (Schibler y Brown, 2005), con efectos diferentes dependiendo de las especies investigadas. Estas acciones de la luz sobre la liberación circadiana de CRF, ACTH y corticosteroides en los mamíferos están bajo un control directo del núcleo supraquiasmático hipotalámico (NSQ), ya que las lesiones de este núcleo anulan dicha ritmicidad y, aunque los trasplantes de NSQ restauran ciertos aspectos rítmicos del animal (como la actividad locomotora), no restauran la ritmicidad circadiana del eje HPA, de lo que se deduce la

existencia de conexiones anatómicas con el NSQ para su correcto control circadiano (Dickmeis, 2009). De hecho, el eje HPA recibe información temporal a través de aferencias procedentes de neuronas del NSQ que alcanzan neuronas productoras de CRF del hipotálamo de los mamíferos (Haus, 2007), habiéndose descrito también proyecciones desde el NSQ que podrían regular de forma directa los ritmos diarios de ACTH (Kalsbeek *et al.*, 2006). Varios estudios sugieren que parte del control circadiano procedente del NSQ hacia el eje HPA podría funcionar de forma inhibitoria y estaría mediado por arginina vasopresina, que tendría una doble acción en el control hipotalámico del eje. Por un lado, su liberación desde neuronas del núcleo paraventricular hacia la eminencia media estimularía la secreción de ACTH, y por otro, actuaría como un neurotransmisor inhibitorio en el control de la actividad de dicho núcleo, probablemente a través de rutas neurales indirectas (Dickmeis, 2009; Kalsbeek *et al.*, 2012). Además de estas acciones centrales del NSQ sobre la secreción circadiana de corticosteroides, en los mamíferos existen evidencias de una regulación directa de la actividad adrenal por el NSQ, a través de una ruta multisináptica neural entre ambos órganos por el sistema nervioso autónomo, que no solapa con las conexiones centrales antes descritas, y que podría modular también la sensibilidad adrenal a la ACTH, así como a factores autocrinos y paracrinos en la propia glándula (Dallman *et al.*, 1978; Bornstein y Chrousos, 1999; Buijs *et al.*, 1999; Buijs y Kalsbeek, 2001; Engeland y Arnhold, 2005). Por tanto, se puede afirmar que el NSQ de los mamíferos utiliza un mecanismo dual en la regulación de la ritmicidad de corticosteroides que incluye un control sobre las hormonas del eje HPA, y un control nervioso autónomo sobre la propia adrenal (Ishida *et al.*, 2005; Kalsbeek *et al.*, 2012). Por otra parte, algunos estudios apuntan a que en este control circadiano de la secreción de cortisol están involucrados mecanismos osciladores asociados al horario de alimentación (Schliber y Brown, 2005; Girotti *et al.*, 2009).

En las interacciones entre relojes circadianos y el eje HPA, además del reloj central, hay que considerar a los relojes periféricos localizados en distintos componentes del eje HPA, entre ellos la glándula adrenal, cuya expresión de CCG puede estar regulada por los propios glucocorticoides. A su vez, los relojes periféricos pueden modular los efectos de los glucocorticoides mediante interacciones entre el heterodímero CLOCK/BMAL1 y los GR (Esquema 10, Nader *et al.*, 2010).



Esquema 10. Interacción entre relojes circadianos y el eje HPA de mamíferos. SCN: núcleo supraquiasmático, PVN: núcleo paraventricular, AVP: arginina vasopresina, GR: receptor de glucocorticoides (Nader *et al.*, 2010).

En los **peces** apenas se ha investigado la posible ritmicidad circadiana del eje HPI, si bien se han descrito ritmos en los niveles circulantes de ACTH en el carpín (Singley y Chavin, 1976) y fluctuaciones diarias del cortisol en varias especies (García y Meier, 1973; Singley y Chavin, 1975; Rance *et al.*, 1982; Noeske y Spieler, 1983; Pickering y Pottinger, 1983; Kühn *et al.*, 1986; Thorpe *et al.*, 1987; Cerdá-Reverter *et al.*, 1998; Pavlidis *et al.*, 1999; Saito *et al.*, 2004; Small, 2005; Ebbesson *et al.*, 2008). En general, los niveles más altos de cortisol plasmático coinciden con el inicio del periodo de actividad del animal. La alimentación puede modificar los niveles de cortisol, produciéndose un incremento en las horas previas al momento habitual de administración del alimento, o tras la ingesta (Spieler y Noeske, 1984; Boujard y Leatherland, 1992; Small, 2005; Vera *et al.*, 2007). Se ha propuesto que el ritmo de cortisol en los peces puede modificarse ante situaciones de estrés o ante necesidades metabólicas concretas (Mommssen *et al.*, 1999).

2.2.1. El reloj biológico de la adrenal.

La regulación *in vivo* de la esteroidogénesis adrenal de mamíferos es compleja, implicando la acción coordinada de la ACTH, la innervación adrenal, factores autocrinos y paracrinos en la propia glándula (Engeland y Arnhold, 2005; Ansurudeen *et al.*, 2006; Fahrenkrug *et al.*, 2008; Dickmeis, 2009) y posiblemente la MEL (Torres-Farfán *et al.*, 2006). Un elemento adicional en esta regulación de la liberación rítmica de corticosteroides puede ser un **reloj circadiano autónomo** en la propia adrenal

(Dallman *et al.*, 1978; Dickstein *et al.*, 1991; Park *et al.*, 1999; Oster *et al.*, 2006b; Son *et al.*, 2008; Torres-Farfán *et al.*, 2008; Valenzuela *et al.*, 2008), cuya existencia se sugirió en estudios pioneros en los que se encontraron ritmos de actividad metabólica y de liberación de glucocorticoides en cultivos de adrenal de hámster (Andrews, 1971) y ritmos de corticosterona en ratas hipofisectomizadas que recibieron implantes de ACTH (Meier, 1976).

Estudios posteriores demostraron la existencia de una ritmicidad circadiana de ciertos genes reloj en la adrenal de varias especies de mamíferos (Oster *et al.*, 2006b; Fahrenkrug *et al.*, 2008; Richter *et al.*, 2008; Torres-Farfán *et al.*, 2008; Valenzuela *et al.*, 2008; Wilkinson, 2008). Esta ritmicidad de genes reloj se ha relacionado con la respuesta de la glándula a la ACTH y el consiguiente incremento de enzimas, como la 3 β HSD, o del propio cortisol (Torres-Farfán *et al.*, 2009). Por ejemplo, se ha demostrado que la expresión de *cry2* es crucial para la activación de la glándula adrenal en el mono capuchino (Torres-Farfán *et al.*, 2009). Sin embargo, otros resultados, como los que relacionan los niveles de StAR con el reloj adrenal, son confusos. Algunos estudios concluyen que el gen reloj *bmal1* dirige la expresión del gen *star* al unirse a la secuencia *E-box* de su promotor (Nakao *et al.*, 2007; Son *et al.*, 2008), mientras que otros trabajos sugieren que los niveles de esta proteína no muestran ritmicidad circadiana, justificado en base a una necesidad rápida de StAR en la respuesta al estrés agudo, y que excluiría a este gen de un control circadiano (Dickmeis y Foulkes, 2011).

El análisis del transcriptoma de la glándula adrenal ha revelado la expresión diaria de múltiples genes implicados en la esteroidogénesis, considerados CCG, entre los que se encuentran el MC2R (receptor de ACTH) y varios componentes de su ruta de señalización intracelular (varias proteínas G, PKA, subunidades de varias fosfatasas, proteínas de transporte de colesterol, etc.; Oster *et al.*, 2006b). Algunos estudios sugieren que el reloj de la adrenal sería el encargado de controlar estos ritmos relacionados con la producción circadiana de esteroides, considerada una de las salidas del reloj de la glándula adrenal de mamíferos (Oster *et al.*, 2006b; Son *et al.*, 2008; Torres-Farfán *et al.*, 2009).

Por tanto, en la actualidad, existen apoyos sólidos a la propuesta de que el reloj circadiano autónomo de la glándula adrenal puede ser un elemento funcional clave del sistema circadiano, al menos en los mamíferos estudiados. Apenas existe información que ilustre la regulación de esta ritmicidad de la propia adrenal. La exposición a la luz durante la noche eleva la expresión de *per1* en la glándula de roedores intactos, pero no en animales con denervación de la adrenal (Ishida *et al.*, 2005), sugiriendo que la

información luminosa podría reiniciar el reloj periférico a través de la inervación simpática, pero el mecanismo subyacente se desconoce.

En los **peces** aún no se ha investigado, hasta el momento actual, si el tejido interrenal posee estas características propias de los relojes biológicos identificadas en la adrenal de los mamíferos.

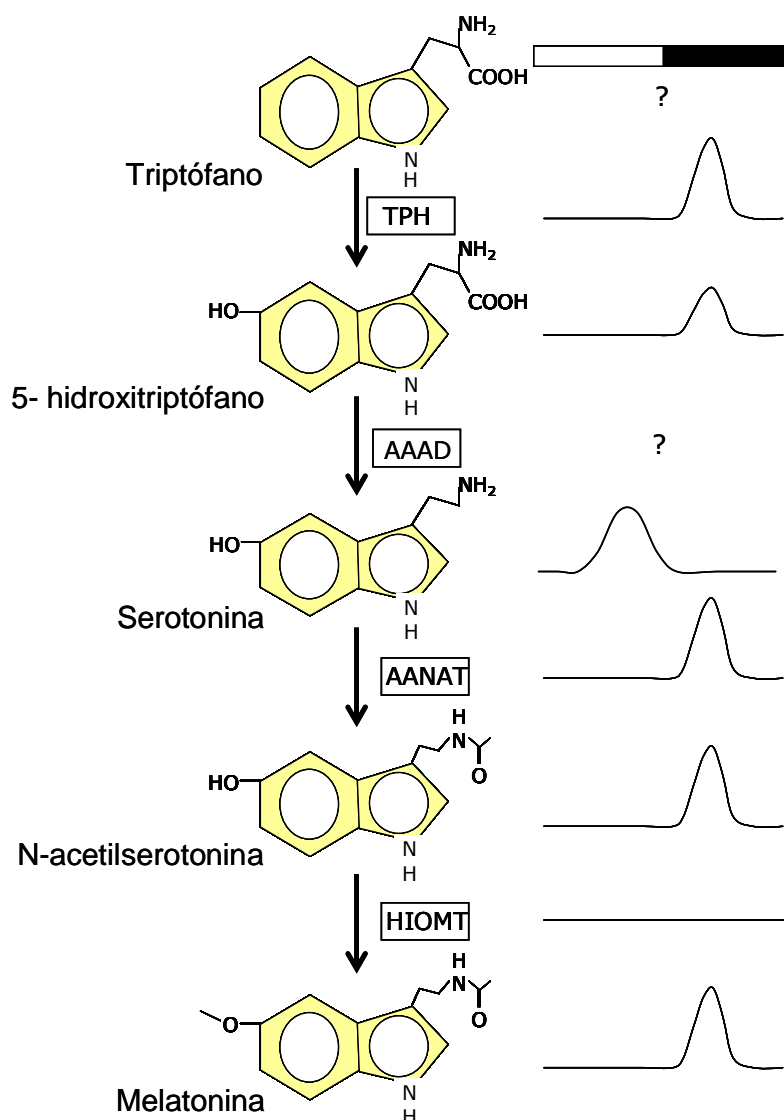
2.3. MELATONINA.

La MEL es una indolamina sintetizada en la glándula pineal y en la retina de los vertebrados mostrando, tanto su síntesis como su secreción, un patrón rítmico diario con valores nocturnos superiores a los diurnos en especies diurnas y nocturnas expuestas a diferentes fotoperiodos (Reiter, 1991). Debido a su naturaleza lipofílica, la MEL no se almacena intracelularmente, de modo que los cambios en su síntesis generan directamente cambios en su liberación.

2.3.1. Síntesis, secreción y receptores.

La ruta biosintética de la MEL está muy conservada en todas las especies estudiadas (Esquema 11). El primer paso en la ruta de biosíntesis de la MEL es la captación de triptófano de la circulación sanguínea mediante transporte activo, que se convierte en 5-hidroxitriptófano mediante la acción de la triptófano hidroxilasa. Este compuesto se descarboxila a serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT) por la descarboxilasa de aminoácidos aromáticos. La AANAT cataliza la acetilación de la serotonina en su extremo N-terminal, considerando a esta enzima limitante de la ruta biosintética de la MEL, ya que su actividad varía a lo largo del ciclo luz/oscuridad de forma paralela a los niveles de MEL, incrementándose tanto los niveles de ARNm como la actividad de la enzima durante la fase oscura del fotociclo diario (Falcón, 1999; Velarde *et al.*, 2010). La hidroxindol-O-metiltransferasa (HIOMT) es la enzima encargada de catalizar el último paso de la ruta de biosíntesis de MEL, que consiste en la metilación del grupo hidroxilo en la posición 5 del anillo indólico (Reiter, 1991).

En el carpín, la pineal es el principal órgano secretor de MEL a la circulación, siendo minoritaria la contribución de origen ocular (Kozuka *et al.*, 1992). En otras especies de peces como la carpa o la trucha se ha propuesto al tracto gastrointestinal como potencial candidato para esta producción extraocular y extrapineal de MEL (Bubenik y Pang, 1997; Fernández-Durán *et al.*, 2007). No obstante, aunque en el tracto gastrointestinal del carpín se ha encontrado la expresión de las enzimas de síntesis de esta hormona aún no se ha probado su funcionalidad en este tejido (Velarde *et al.*, 2010).



Esquema 11. Ruta biosintética de la melatonina. Las gráficas de la derecha muestran el perfil diario de la actividad de las enzimas de la ruta y del contenido de los compuestos intermedios. TPH: triptófano hidroxilasa, AAAD: L-aminoácido aromático descarboxilasa, AANAT: arilalquilamina-N-acetiltransferasa, HIOMT: hidroxindol-O-metiltransferasa. Las barras horizontales blanca y negra representan las fases de luz y oscuridad, respectivamente.

El principal factor ambiental regulador de las oscilaciones diarias de la síntesis de MEL y actividad AANAT, así como de la duración de la señal, es el fotoperiodo (Reiter, 1993). Numerosos estudios en peces han puesto de manifiesto una acción directa de la luz anulando los ritmos diarios de actividad AANAT (Iuvone y Besharse, 1983) y de síntesis de MEL (Iigo *et al.*, 2003), tanto *in vivo* (Kezuka *et al.*, 1992) como en cultivos *in vitro* de glándula pineal de carpín (Kezuka *et al.*, 1989). Además del fotoperiodo, en los poiquiloterms la temperatura ambiental también ejerce un papel

clave en la regulación de los ritmos diarios y estacionales de MEL (Iigo y Aida, 1995; Falcón *et al.*, 1996; García-Allegue *et al.*, 2001).

En todos los vertebrados estudiados se han identificado, hasta el momento, dos tipos de **receptores** de MEL de alta afinidad, MT1 y MT2, también denominados Mel1a y Mel1b, respectivamente, que pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G (Reppert *et al.*, 1996; Dubocovich *et al.*, 2002). En vertebrados no mamíferos se ha descrito un tercer subtipo de receptor de alta afinidad denominado Mel1c (Reppert *et al.*, 1995). Además, se han identificado sitios de unión para MEL de baja afinidad, denominados MT3, que no parecen ser verdaderos receptores acoplados a proteínas G, sino más bien de enzimas citosólicas con actividad quinona reductasa-2, posiblemente implicadas en procesos de detoxificación (Nosjean *et al.*, 2000; Mailliet *et al.*, 2005).

En todas las especies de peces estudiadas se han identificado receptores de MEL de alta afinidad principalmente en áreas asociadas con funciones de percepción e integración visual (Bayarri *et al.*, 2004; López-Patiño *et al.*, 2008). En el carpín, se han encontrado receptores de alta afinidad de MEL en el techo óptico, tálamo e hipotálamo, y en menor densidad en otras localizaciones encefálicas, incluyendo la hipófisis (Iigo *et al.*, 1994; Ikegami *et al.*, 2009a). Además, en varias especies se ha descrito la existencia de un ritmo diario en la afinidad de los receptores de MEL en el encéfalo, siendo mayor al comienzo de la noche (Iigo *et al.*, 2003). También se han descrito receptores de MEL en localizaciones periféricas, como el iris, riñón, tubo digestivo, bazo, corazón, hígado y branquias de varias especies de peces (Kulczykowska *et al.*, 2006; López-Patiño *et al.*, 2008; Sauzet *et al.*, 2008; Ikegami *et al.*, 2009a, 2009b; López-Patiño *et al.*, 2012).

2.3.2. Efectos de la melatonina en los peces.

Son numerosas las funciones en las que se ha implicado a la MEL en los peces, participando en general en el ajuste temporal de funciones rítmicas diarias y estacionales (Falcón *et al.*, 2007). En esta introducción nos limitaremos a comentar solo algunas de ellas, en el contexto de los objetivos planteados en la presente Tesis Doctoral.

2.3.2.1. Melatonina y actividad locomotora.

El primer estudio que analizó la relación entre la MEL y la actividad locomotora en peces demuestra que la presencia de la indolamina en el agua promueve un estado similar al del sueño en larvas del pez cebra (Zhdanova, 2001). Esta acción parece ser general en las especies de peces estudiadas hasta la fecha. En el carpín, que a pesar

de tener un patrón de actividad locomotora flexible se considera una especie diurna, una única inyección IP de MEL reduce la actividad locomotora de los animales, independientemente de si la inyección se lleva a cabo durante la fase luminosa o durante la fase oscura del fotociclo (López-Olmeda *et al.*, 2006a). En otra especie diurna, *Halichoeres trimaculatus*, una inyección aguda IP de MEL reduce la actividad locomotora, así como la tasa respiratoria de los peces (Hur *et al.*, 2012). Por otra parte, en especies nocturnas, como la tenca (*Tinca tinca*), se observa que la administración aguda de MEL durante la fase oscura no produce ningún cambio en los niveles de actividad, mientras que si la hormona se administra durante el día, se observa una pequeña reducción de la misma (López-Olmeda *et al.*, 2006a). Esta diferencia de efectos de la MEL según el hábito de vida de los peces permite sugerir que la modificación de la actividad locomotora por la hormona es consecuencia de una interacción con el sistema circadiano (López-Olmeda *et al.*, 2006a).

El tratamiento crónico con MEL reduce la actividad locomotora en todas las especies de peces estudiadas, independientemente de sus perfiles de actividad. Así, cuando la hormona es inyectada IP de forma crónica al final de la fotofase se observa una reducción de la actividad locomotora total del carpín (Martínez-Álvarez *et al.*, 2004; López-Olmeda *et al.*, 2006a). En especies como la lubina (*Dicentrarchus labrax*), que muestra patrones de actividad nocturnos y crepusculares, la ingesta con dietas enriquecidas con triptófano reduce los valores de actividad. La suplementación de la dieta con MEL reduce aun más la actividad locomotora y la limita a las horas previas a la hora habitual de administración del alimento (Herrero *et al.*, 2007). Estos resultados concuerdan con el efecto sincronizador de la actividad descrito para la MEL en algunos mamíferos, y corrobora la idea de la interacción entre la MEL y el sistema circadiano en la regulación de la actividad locomotora.

2.3.2.2. Melatonina e ingesta.

Los efectos de la melatonina sobre la ingesta de los peces se han estudiado de forma limitada, y la escasa información disponible resulta ser variable en función de los hábitos de alimentación de la especie y de los procedimientos de administración de la hormona. Los tratamientos agudos con MEL revelan que esta indolamina produce una acción anorexigénica tras su administración IP (pero no ICV) en el carpín, tanto si la inyección es durante la fotofase como durante la escotofase (Pinillos *et al.*, 2001; López-Olmeda *et al.*, 2006a). Sin embargo, en peces nocturnos, como la tenca, únicamente la MEL inyectada IP durante la fase de luz reduce la ingesta, no observándose ningún efecto de la hormona cuando se administra durante la fase oscura (López-Olmeda *et al.*, 2006a). La administración crónica de MEL también

reduce la ingesta. En la lubina, la MEL administrada de forma oral, además de disminuir la ingesta total, también reduce la ingesta de carbohidratos y en menor medida de proteínas, sin alterar la ingestión de lípidos (Rubio *et al.*, 2004). Se ha sugerido que esta acción anorética de la MEL podría realizarse, en el pez cebra, de manera indirecta inhibiendo la acción de los péptidos orexigénicos (NPY, ghrelina) y estimulando la actividad de los anorexigénicos (leptina) (Piccinetti *et al.*, 2010). Por otro lado, se ha propuesto que la acción relajante de la MEL en la motilidad intestinal del carpín (Velarde *et al.*, 2009b) justificaría una relación funcional entre la indolamina y el sistema digestivo, que podría ser responsable, al menos en parte, de la reducción de la ingesta producida por la hormona.

Este efecto anoréxico de la MEL en tratamientos crónicos parece afectar al crecimiento de los peces, si bien se han encontrado resultados contradictorios en función de la especie y/o el tratamiento. Así, en salmones atlánticos (*Salmo salar*) implantados con MEL se encontró un aumento significativo del peso corporal (Porter *et al.*, 1998), mientras que en truchas arco iris implantadas con MEL se observa una reducción tanto del peso corporal como del crecimiento (Taylor *et al.*, 2005). Este último resultado coincide con el descrito en el carpín, donde el tratamiento con la hormona reduce el peso corporal y las reservas de glucógeno muscular y lípidos hepáticos (De Pedro *et al.*, 2008). En estudios *in vitro* también se han obtenido resultados variables, observándose una inhibición de la secreción de GH por el tratamiento con MEL en hipófisis de trucha estimuladas con AMPc, mientras que la incubación únicamente con dosis fisiológicas de MEL estimula la producción de GH e inhibe la de prolactina (Falcón *et al.*, 2003).

Por tanto, en las acciones de la MEL sobre la ingesta y el crecimiento pueden estar produciéndose efectos directos de la hormona tanto en la liberación de neuropéptidos reguladores a nivel hipotálamo e hipofisario, como en distintas localizaciones periféricas (Falcón *et al.*, 2010).

2.3.2.3. Interacciones entre la melatonina y el eje HPI.

El significado fisiológico de las posibles interacciones entre la MEL y el eje HPA es desconocido en la actualidad. Sin embargo, y teniendo en cuenta que los ritmos diarios de MEL y cortisol están desfasadas en especies diurnas, surge la hipótesis de considerar que algunas acciones de la MEL sobre la glándula adrenal estén dirigidas a modular la producción de cortisol a fin de regular la fisiología del sueño y el descanso (Torres-Farfán *et al.*, 2003a).

Varios estudios en diferentes especies de vertebrados han demostrado que la glándula pineal (a través de la MEL) tiene un efecto inhibitorio sobre la actividad

adrenal. En mamíferos se ha demostrado una reducción en la liberación de cortisol tras el tratamiento con MEL (Konakchieva *et al.*, 1997, 1998; Rao *et al.*, 2001), al igual que en las aves, en las que la inyección ICV de MEL disminuye los niveles plasmáticos de corticosterona tras la exposición a un estrés subcrónico, impidiendo además la activación del eje HPA por inyección ICV de CRF tras la administración de MEL (Saito *et al.*, 2005). En los peces, Munro (1986) publicó un efecto supresor de la agresividad en *Aequidens pulcher* por la inyección intracraneal de MEL. Poco después, estudios preliminares sobre el efecto de la glándula pineal en la actividad adrenal demostraron que la pinealectomía produce una hipertrofia de las células esteroideogénicas interrenales en el pez gato africano (*Clarias gariepinus*; Agha y Joy, 1989). Estos resultados son las primeras pruebas que apoyan una interacción funcional entre la MEL y la activación del eje HPA en los peces. Más recientemente, se ha demostrado que la suplementación del alimento tanto con triptófano como con MEL reduce los niveles plasmáticos de cortisol en la lubina (Herrero *et al.*, 2007).

La interacción entre la MEL y el eje HPA parece estar mediada por una acción directa de la neurohormona a distintos niveles del mismo, al menos en los mamíferos. La colocalización de receptores de MEL en neuronas productoras de arginina vasopresina y neuronas parvocelulares productoras de CRF en el núcleo paraventricular hipotalámico de roedores (Wu *et al.*, 2006) y en la corteza adrenal de primates no humanos (Torres-Farfán *et al.*, 2003a, 2003b) constituyen la base neuroanatómica de dicha participación de la MEL en una modulación directa del eje HPA. El tratamiento crónico con MEL reduce el contenido hipotalámico de CRF tras la exposición a un estrés agudo (Konakchieva *et al.*, 1997), y la liberación de ACTH en hipófisis de rata cultivada en presencia de CRF (Konakchieva *et al.*, 1998). La MEL disminuye los niveles circulantes de glucocorticoides por medio de una acción directa de la hormona en la glándula adrenal de la ardilla (Rao *et al.*, 2001). En cultivos de glándula adrenal de oveja, primates no humanos y humanos, se ha demostrado que la adición de MEL al medio inhibe los niveles de glucocorticoides liberados en respuesta a la estimulación con ACTH (Torres-Farfán *et al.*, 2003a, 2003b, 2008; Richter *et al.*, 2008) a través de receptores MT1 (Torres-Farfán *et al.*, 2003a; Campino *et al.*, 2008; Richter *et al.*, 2008).

Estudios recientes sugieren que la MEL puede actuar como nexo de unión entre la estimulación por ACTH, los genes reloj y la esteroideogénesis adrenal en algunos mamíferos. Así, el tratamiento con MEL inhibe la expresión de los genes reloj estimulados por el tratamiento con la ACTH (*per1*, *per2*, *cry2* y *bmal1*), efecto probablemente mediado por receptores MT1 (Torres-Farfán *et al.*, 2008, 2009; Richter *et al.*, 2008; Valenzuela *et al.*, 2008; Campino *et al.*, 2011). Esta modificación de la

expresión de genes reloj por MEL en la adrenal de mamíferos se realiza no sólo de forma directa en la propia glándula, sino también a través de acciones en el NSQ (Buijs *et al.*, 1997; Kalsbeek y Buijs, 2002) e incluso sobre los propios niveles de glucocorticoides (Balsalobre *et al.*, 2000).

2.3.2.4. Melatonina como sincronizador.

Se ha propuesto que la producción rítmica de MEL es utilizada por los organismos para sincronizar los cambios en parámetros como la reproducción, la hibernación o el peso corporal, producidos como consecuencia de la adaptación a las fluctuaciones ambientales (Falcón, 1999; Arendt y Skene, 2005; Hardeland, 2008).

También se ha analizado el efecto de la hormona en la sincronización de la ritmicidad de la actividad locomotora en homeotermos. En algunas **aves**, la MEL exógena acelera la resincronización de los ritmos de actividad locomotora y de actividad alimentaria tras cambios en factores ambientales como el ciclo luz/oscuridad o el horario de alimentación, también en animales pinealectomizados (Gwinner y Benzinger, 1978; Beldhuis *et al.*, 1988; Cassone, 1990; Hau y Gwinner, 1994, 1995; Heigl y Gwinner, 1995, 1999; Abraham *et al.*, 2000). Sin embargo, existen excepciones a este perfil general, tanto en especies diurnas como nocturnas (Murakami *et al.*, 2001). En los **mamíferos**, la MEL también es una hormona con una potente acción sincronizadora. En humanos, está bien documentada la eficacia terapéutica de la administración diaria de MEL en la mejora de la sincronización a los ciclos luz/oscuridad, tanto en ancianos como en individuos ciegos o con trastornos del ciclo sueño/vigilia, y en alteraciones asociadas al *jet lag* (Zhdanova *et al.*, 1996; Arendt, 1999; Burgess *et al.*, 2010). En otras especies, tanto diurnas (macaco, *Macaca mulatta*) como nocturnas (roedores), el tratamiento con MEL también mejora la resincronización de los ritmos de actividad locomotora ante cambios en las condiciones fotoperiódicas (Marumoto *et al.*, 1996; Redman *et al.*, 1995; Van Reeth *et al.*, 1997; Li *et al.*, 2004; Masuda y Zhdanova, 2010). Sin embargo, este efecto de la MEL exógena puede variar notablemente en función de la hora de administración, de la dosis y del cronotipo de la especie (Martinet *et al.*, 1996; Isobe *et al.*, 2002). Por el momento no existe información relativa a esta función de la MEL en los peces.

3. ESPECIES DE ESTUDIO.

3.1. CARPÍN (*Carassius auratus*).

El carpín, *Carassius auratus*, es un teleósteo dulceacuícola perteneciente al Orden *Cipriniforme*, Familia *Ciprinidae*, Subfamilia *Ciprininae*. Es una especie originaria de China, que ha sido domesticada y criada en cautividad durante siglos,

obteniéndose diversas variedades gracias a mutaciones inducidas por cruce selectivo. Se introdujo en Occidente alrededor del siglo XVII y actualmente se cría principalmente como pez ornamental.

Morfológicamente, el carpín presenta el cuerpo compacto, con la aleta dorsal de base amplia y sin barbillones bucales (Fotografía 1). Originalmente de color pardo amarillento o verdoso con reflejos dorados por los flancos y la superficie ventral, en el medio natural adquieren su color rojizo característico tras varios años. Los adultos suelen medir entre 10 y 20 cm, pero pueden llegar hasta unos 45-50 cm (Muss y Dahlström, 1981). Su crecimiento por lo general es rápido, aunque viene determinado por la cantidad de alimento que pueda extraer de su hábitat.



Fotografía 1. Ejemplar adulto de carpín dorado (*Carassius auratus*).

El carpín es una especie que habita en aguas poco profundas de lagunas y ríos de corriente lenta, con fondos blandos ricos en vegetación. Durante el invierno permanece casi completamente enterrado en el barro, limitando mucho su actividad hasta la primavera (Muss y Dahlström, 1981). Puede vivir en aguas templadas y frías (10-21°C), de poca o nula acidez (pH 7-7,5), aunque también soporta las temperaturas elevadas, escasez de oxígeno disuelto e incluso ciertos tipos de contaminación acuática. Por esta razón se trata de una especie bastante resistente a las condiciones de estrés, a lo que también contribuye el hecho de ser animales domésticos, adaptados desde hace tiempo a la manipulación humana.

La freza se produce entre los meses de mayo y junio, en aguas con densa vegetación, si bien este periodo puede variar en función de la temperatura del agua. Dependiendo de su tamaño, la hembra puede llegar a poner entre 200.000 y 400.000 huevos, que deposita adheridos a las plantas acuáticas de la orilla y que tardarán entre 3 y 8 días en eclosionar, dependiendo de la temperatura del agua.

Es un animal omnívoro y bentónico, que en su hábitat natural se alimenta fundamentalmente de organismos planctónicos, gusanos, larvas de insectos, así como

de plantas acuáticas (algas principalmente) que se encuentran en el barro del fondo. En condiciones de laboratorio se ha podido demostrar que selecciona principalmente carbohidratos en su dieta, seguido de grasas y proteínas (Sánchez-Vázquez *et al.*, 1998). Esta especie ha sido clave en el conocimiento actual de la regulación de la ingesta en los peces, proceso en el que están involucrados numerosos neuropéptidos y hormonas de origen central y periférico (Volkoff *et al.*, 2005), entre ellos la MEL (Pinillos *et al.*, 2001).

El carpín presenta distintos patrones de actividad locomotora en condiciones de luz/oscuridad, pudiendo mostrar ritmos diurnos, nocturnos o incluso una elevada actividad a lo largo de todo el fotociclo (Iigo y Tabata, 1996). Además de la luz, el horario de alimentación actúa como un potente sincronizador de la actividad locomotora en esta especie (Vera *et al.*, 2007; Feliciano *et al.*, 2011; Vivas *et al.*, 2011), exhibiendo una robusta FAA en las horas previas al horario habitual de alimentación (Aranda *et al.*, 2001; Kulczykowska y Sánchez-Vázquez, 2010). La FAA puede observarse durante varios días en ausencia de *zeitgebers*, lo que sugiere su carácter endógeno. En presencia de ambos factores, ciclo luz/oscuridad y alimentación en horario fijo, los peces pueden sincronizar su actividad locomotora tanto a uno de los dos *zeitgebers* como a ambos (Aranda *et al.*, 2001). Varios estudios han destacado la gran plasticidad del sistema circadiano de este teleósteo lo que, junto a su fácil manejo, los requerimientos limitados en su mantenimiento, su fácil disponibilidad y su rápida adaptación a las condiciones de laboratorio, le han configurado como una especie ampliamente utilizada en investigación científica.

3.2. TRUCHA ARCO IRIS (*Oncorhynchus mykiss*).

La trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) es un pez teleósteo perteneciente al Orden *Salmoniforme*, Familia *Salmonidae*, Subfamilia *Salmoninae*. Es una especie eurihalina de rápido crecimiento, originaria de la costa del Pacífico norteamericano, habitando una franja comprendida entre el norte de México y Alaska, desde donde fue exportada a Europa a finales del siglo XIX (Muss y Dahlström, 1981).

Morfológicamente, la trucha arco iris presenta una ancha banda de color rosáceo sobre el costado, desde la cabeza a la base de la cola, lo que le da su nombre característico, y presenta una aleta caudal moteada de negro (Fotografía 2). Los adultos suelen medir unos 70 cm, pudiendo llegar hasta 1 m de longitud (Muss y Dahlström, 1981).



Fotografía 2. Ejemplar adulto de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*).

La trucha arco iris habita en lagos, ríos y afluentes de Eurasia y Norteamérica. Se trata de un animal que en general requiere aguas de buena calidad, con un buen aporte de oxígeno. Necesitan aguas frías, aunque pueden vivir en un amplio intervalo de temperaturas (0-21°C), siempre que no superen los 25°C (Kottelat y Freyhof, 2007).

Las hembras de trucha desovan entre febrero y mayo, con temperaturas entre 10-15°C (Kottelat y Freyhof, 2007), en tramos de agua dulce con corriente moderada o rápida.

La trucha es un animal carnívoro, que se alimenta de presas animales con alto contenido proteico (40-45%), la mayor parte invertebrados. Etológicamente, es una especie solitaria (aunque a veces gregaria) y territorial. Su perfil de actividad locomotora depende de la presencia de luz, desplazándose por el fondo durante el día y por la superficie durante la noche (Sánchez-Vázquez y Tabata, 1998). Es sedentario, de manera que cada individuo habita en un lugar bien definido y desde allí se desplaza para la búsqueda de alimento, que se realiza durante el periodo de luz, con dos máximos de actividad, uno en las primeras horas del día y otro unas horas antes de la noche (Haury *et al.*, 1991; Neveu, 1991; Sánchez-Vázquez y Tabata, 1998).

Es una especie ampliamente utilizada en investigación, en parte debido a su interés comercial. Su alta tasa de crecimiento ha convertido a la trucha arco iris en una de las principales especies de interés en acuicultura, lo que ha favorecido su distribución por todos los continentes (a excepción de la Antártida). El principal productor mundial de trucha arco iris es Chile, aunque también se produce en Noruega, Francia, España, Dinamarca, Italia, EE.UU., Alemania, Irán y Reino Unido (FAO, 2006).

II. OBJETIVOS / OBJECTIVES

Uno de los principales retos de la acuicultura actual es el control del bienestar de los animales, especialmente dirigido a minimizar las consecuencias negativas asociadas al estrés que inevitablemente conlleva el manejo de los peces en este ámbito. Como consecuencia de estas situaciones se produce una activación del eje hipotálamo-hipófisis-interrenal, que conduce a un incremento de la liberación de cortisol como producto final de dicha activación, y la alteración de parámetros bioquímicos y comportamentales (como la ingesta), con graves consecuencias para la supervivencia en caso de convertirse en crónicas.

La melatonina es una neurohormona clave en el sistema circadiano de los vertebrados y desempeña, en general, un papel sincronizador de numerosas funciones rítmicas con los cambios cíclicos ambientales. Desde hace décadas se ha descrito para la melatonina un papel inductor del sueño en humanos y en los últimos años se ha propuesto que puede actuar como agente reductor de las respuestas al estrés en algunas especies de aves y mamíferos, sugiriendo para ello una acción directa de la hormona en el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal, y particularmente en la esteroidogénesis adrenal.

El carpín (*Carassius auratus*) es un teleósteo que muestra un sistema circadiano robusto con ritmos marcados de actividad locomotora. Esta especie posee un oscilador intrapineal capaz de generar un ritmo diario de secreción de melatonina que, entre otras funciones, puede actuar como un potente agente anorexigénico cuando se administra de forma exógena.

El objetivo general de la presente Tesis Doctoral es el estudio de aspectos funcionales del eje hipotálamo-hipófisis-interrenal del carpín (HPI) y su relevancia como diana de los efectos de la melatonina. En particular, se ha investigado su posible papel en la organización circadiana y su activación en base, principalmente, a parámetros indicativos de respuesta a estrés, como la actividad locomotora, la ingesta, los niveles circulantes de cortisol, glucosa y lactato, y la expresión de genes funcionales del eje HPI. Además, se ha abordado el estudio del posible papel de la melatonina en la sincronización de la actividad locomotora en el carpín. De forma específica, se han desarrollado los siguientes objetivos:

- Investigar la posible existencia de osciladores circadianos funcionales en distintos niveles del eje HPI mediante el análisis de la expresión de genes funcionales del mismo (*precursor de crf* en el hipotálamo, *crf-r1* y *pomc* en la hipófisis y *mc2r* y *star*

II. OBJETIVOS

en el tejido interrenal) y de genes reloj (*per1a*, *per2a*, *per3*, *cry1a*, *cry2a*, *cry3*, *bmal1a*, *clock1a* y “*clock2-like*”, en todos los tejidos), en presencia de los *zeitgebers* ciclo luz/oscuridad y horario de alimentación.

- Caracterizar el efecto de la administración repetida de melatonina en la actividad locomotora y los niveles plasmáticos de cortisol en el carpín, utilizando dos vías, intracerebroventricular (central) e intraperitoneal (periférica), e investigar si la reducción de la actividad locomotora observada se debe a la acción anorexigénica inducida por la hormona.
- Investigar el posible papel de la melatonina en la modulación de las respuestas a la exposición a un estrés agudo en el carpín, valorando sus efectos sobre indicadores estándar de estrés (niveles circulantes de cortisol, glucosa y lactato), parámetros comportamentales (actividad locomotora e ingesta), y en la expresión de genes funcionales del eje HPI (*precursor de crf* en el hipotálamo, *crf-r1* y *pomc* en la hipófisis, y *mc2r* y *star* en el riñón).
- Determinar las posibles dianas de la melatonina en el eje HPI, mediante estudios *in vivo* de estimulación del eje a nivel hipotalámico (administración intracerebroventricular de CRF) e hipofisario (administración intraperitoneal de ACTH), y mediante cultivos de tejido interrenal en presencia de melatonina, comparando la respuesta en dos especies de teleósteos: el carpín y la trucha arco iris.
- Caracterizar la posible función sincronizadora de la melatonina en la ritmicidad diaria de la actividad locomotora, expresión de genes reloj y contenido de monoaminas encefálicas en carpines mantenidos en ausencia de los *zeitgebers* ciclo luz/oscuridad y horario de alimentación.

One of the main challenges for current aquaculture is the control of animal welfare, particularly focused on minimizing the negative consequences associated to the unavoidable stress related to fish handling in this field. Due to these situations, an activation of the hypothalamus-pituitary-interrenal axis is triggered, which results in an increase of cortisol release as the final product of axis activation, and an alteration of some biochemical and behavioural parameters (such as food intake), with severe consequences for survival in case of becoming chronic.

Melatonin is a key neurohormone of the vertebrate circadian system and plays a role, in general, in synchronizing several rhythmic functions to cyclic environmental changes. A sleep-inducing role for melatonin has been described for decades in humans, and for the last years it has been proposed to act by reducing stress responses in some avian and mammalian species, suggesting a direct action of the hormone on the hypothalamus-pituitary-adrenal axis, and particularly on adrenal steroidogenesis.

Goldfish (*Carassius auratus*) is a teleost that shows a robust circadian system with marked locomotor activity rhythms. This species has an intrapineal oscillator able to generate a daily rhythm of melatonin secretion which, among other functions, can act as a potent anorectic agent when it is exogenously administered.

The general objective of this PhD Thesis is to study functional aspects of the hypothalamus-pituitary-interrenal (HPI) axis in goldfish and its relevance as a target for melatonin effects. Particularly, we have investigated its possible role on circadian organization and its activation, based on stress response parameters such as locomotor activity, food intake, circulating levels of cortisol, glucose and lactate, and expression of functional genes of the HPI axis. Besides, the possible role of melatonin on locomotor activity synchronization in goldfish has been also studied. Specifically, the following objectives have been addressed:

- To investigate the possible existence of functional circadian oscillators at different levels of the HPI axis by analysing the expression of functional genes (*crf precursor* in the hypothalamus, *crf-r1* and *pomc* in the pituitary and *mc2r* and *star* in the interrenal tissue) and clock genes (*per1a*, *per2a*, *per3*, *cry1a*, *cry2a*, *cry3*, *bmal1a*, *clock1a* and “*clock2-like*”, in all the tissues), in the presence of both light/dark cycle and feeding time *zeitgebers*.

- To characterize the effect of repeated melatonin administration on locomotor activity and plasma cortisol levels in goldfish, considering two different ways, intracerebroventricular (central) and intraperitoneal (peripheral), and to investigate whether the observed reduction of locomotor activity is due to the anorectic action induced by the hormone.
- To investigate the possible role of melatonin as a regulator of the physiological responses to acute stress exposure in goldfish. Particularly, its effects on stress standard indicators (circulating levels of cortisol, glucose and lactate), behavioural parameters (locomotor activity and food intake) and the expression of functional genes of HPI axis (*crf precursor* in the hypothalamus, *crf-r1* and *pomc* in the pituitary and *mc2r* and *star* in the kidney) have been studied.
- To determine the possible targets for melatonin in the HPI axis, by carrying out two approaches: *in vivo* experiments by stimulation at hypothalamic (intracerebroventricular administration of CRF) and pituitary level (intraperitoneal administration of ACTH), and *in vitro* cultures of interrenal tissue in the presence of melatonin, comparing the response in two teleost species: goldfish and rainbow trout.
- To characterize the possible function of melatonin on the synchronization of daily locomotor activity rhythms, clock genes expression, and brain monoamines content in goldfish in the absence of both light/dark cycle and feeding time *zeitgebers*.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIALES.

1.1. INSTRUMENTAL.

a) General.

- Aguja de 0,3 y 0,5 mm (Microlance).
- Bloques de refrigeración para tubos de 0,2 ml (Eppendorf).
- Cánulas de 0,5 mm de diámetro interno (Venocath 18).
- Comederos automáticos para acuarios (3581, Eheim).
- Cubetas de electroforesis (Mini-Sub Cell GT, Bio-Rad).
- Cubetas para espectrofotometría (Eppendorf).
- Film adhesivo transparente para placas de 96 pocillos (Bio-Rad).
- Filtros de manta de cielo.
- Filtros para acuarios (Filtramax 1, ICA).
- Filtros poliamida 0,45 µm (Sartorius).
- Fotorrelés infrarrojos (E3S-AD62, Omron).
- Jeringuillas de plástico de 1 ml (Plastipak, BD).
- Lupa binocular (Meiji, EMT).
- Mamparas protectoras de radiactividad (Amersham Biosciences).
- Material quirúrgico para disección.
- Microjeringas de cristal de 5 y 50 µl (Hamilton).
- Pipetas automáticas (Biohit, Eppendorf y Gilson).
- Placas 24 pocillos (Iwaki) y 96 pocillos (Nunc y Bio-Rad).
- Puntas de pipeta con filtro (Sorenson y Neptuno).

b) Equipos.

- Actímetro (C16 S 64, Micronec).
- Agitador multitubos (4010, Corning).
- Autoclave (CV.EL 18l, CertoClav).
- Balanzas de precisión (1405, Sartorius y 404, Sauter).
- Bomba de vacío (A-35, Uniscience).
- Cámara refrigeradora (Koxka).
- Centrífuga refrigerada (Megafuge 1.0R, Heraeus).
- Congelador a -25°C (Liebherr) y a -80°C (U410, New Brunswick Scientific).
- Contador γ (Wallac Wizard 1470 Automatic Gamma Counter, Perkin Elmer Lifesciences).
- Destiladores (Millipore).
- Equipos informáticos (LG y Dell).
- Espectrofotómetro para placas (UVM 340, Oasys).

- Estufa (TD).
- Frigorífico a 4°C (Bluesky).
- Microcentrífugas (Biofuge Pico, Heraeus y 5415R, Eppendorf).
- pHmetro (210, Hanna Instruments).
- Picadora de hielo (Scotsman, AF10).
- Sonicador (UP50H, Dr. Gietscher).
- Vórtex (Vortex Genie-2, Scientific Industries).

c) Biología molecular.

- *Bioanalyzer* (Agilent Technologies).
- Biofotómetro (Biophotometer Plus, Eppendorf).
- Campana de flujo laminar (IDL-55V, Indelab).
- Equipo de captación de imágenes de geles de electroforesis (Unisave).
- Filtros nitrocelulosa 0,025 µm (Millipore).
- Fuente de alimentación para electroforesis (Powerpac 300, Bio-Rad).
- Homogeneizador (Precellys 24, Bertin Technologies).
- Homogeneizador Ultra-Turrax® T8 (IKA).
- Microondas (Samsung).
- *Nanodrop* (ND-1000, Saveen Werner).
- Secuenciador (ABI PRISM 377 DNA, Applied Biosystems).
- Termociclador PCR cuantitativa (CFX96TM Real-Time System, Bio-Rad).
- Termociclador (Mastercycler gradient, Eppendorf).
- Transiluminador UV (TCP-15.M, Vilber Lourmat).

d) Cultivos.

- Baño termostatzado (320 OR, Unitronic).
- Bomba peristáltica (205S, Watson Marlow).
- Colector de fracciones (Retriever II, ISCO).

e) Cromatografía líquida de alta presión (HPLC).

- Bomba peristáltica cuaternaria (G1311A, Agilent).
- Célula de acondicionamiento (5021, ESA).
- Célula analítica coulométrica (5011, ESA).
- Columna de cromatografía de fase reversa (120ODS-B, 5 µm 12,5x0,46, Teknokroma).
- Compartimento termostatzado para columna de HPLC (Agilent 1100).
- Detector electroquímico (Coulchem II, ESA).

- Inyector automático (329A, Agilent 1100).

f) Programas informáticos.

- Software de análisis de espectrofotometría (versión 1.2.0.2, DigiRead).
- Software de cronobiología (El Temps®, Version 1, 192; Prof. Díez-Noguera, Universidad de Barcelona).
- Softwares para el diseño de primers (Primer 3, BioTools, Universidad de Massachusetts; Primer Express, Applied Biosystems).
- Software estadístico (Statgraphics, StatPoint Technologies).
- Software HPLC (Clarity Chromatography Station, Micronec).
- Software de registro de actividad locomotora (Adq16, Micronec).
- Software secuenciación y ensamblaje de nucleótidos (*DNA Baser*, Heracle BioSoft SRL).

1.2. PRODUCTOS.

1.2.1. Reactivos.

a) General.

- Ácido 8-anilino-1-naftaleno sulfónico (ANS) (A-1028, Sigma).
- Ácido clorhídrico (HCl) (320331, Sigma).
- Ácido etilendiamino tetraacético (EDTA) (E-5134, Sigma).
- Ácido fosfórico 85% (79617, Sigma).
- Ácido perclórico 60% (PCA) (Ac 1755, Scharlau).
- Agua destilada (Millipore).
- Albúmina de suero bovino (BSA) (A-7030, Sigma).
- Azida sódica (NaN_3) (S-8032, Sigma).
- Bicarbonato sódico (NaHCO_3) (S-6014, Sigma).
- Bisulfito sódico (S-9000, Sigma).
- Carbógeno (95% O_2 :5% CO_2) (Air Liquide).
- Carbonato sódico (Na_2CO_3) (S7795, Sigma).
- Cloroformo (C-2432, Sigma).
- Cloruro sódico (NaCl) (S-9888, Sigma).
- Etanol absoluto (141085, Panreac).
- Etilendiamino tetraacetato de sodio (EDTA-Na_2) (E-5134, Sigma).
- 2- fenoxietanol (P-1126, Sigma).
- Formaldehído (F-8775, Sigma).
- Fosfato ácido de sodio (NaH_2PO_4) (6346, Merck).
- γ -globulina bovina (BGG) (49030, Sigma).

- Heparina al 1% (768200, Rovi).
- Hidróxido sódico (NaOH) (141687, Panreac).
- Hielo seco (Carbueros Metálicos).
- Hormona liberadora de corticotropina humana (CRFh) (C-3167, Sigma).
- Isopropanol (I-9516, Sigma).
- Nitrógeno líquido (Air Liquide).
- Parafina (251794, Panreac).
- Polietilenglicol (PEG) (807491, Merck).
- Reactivo de Folin-Ciocalteu (251567, Panreac).
- Sulfato cúprico (141270, Panreac).
- Tampón Tris acetato-EDTA 10X (T-9650, Sigma).
- Tartrato sódico-potásico (8087, Merck).
- Tricaína-metanosulfonato (MS-222) (A-5040, Sigma).

b) Biología molecular.

- Acetato sódico (1.06268, Merck).
- Agarosa (A-9539, Sigma).
- Agarosa de bajo punto de fusión (A-9414, Sigma).
- Bromuro de etidio 10 mg/ml (E-1510, Sigma).
- Cebadores para qRT-PCR (Sigma).
- Cebadores aleatorios 3 µg/µl (Invitrogen).
- DNA remove (RD055, Real).
- dATP 25 µmol (Invitrogen).
- dCTP 25 µmol (Invitrogen).
- dGTP 25 µmol (Invitrogen).
- dTTP 25 µmol (Invitrogen).
- Dietilpirocarbonato (DEPC) (D-5758, Sigma).
- Ditiotreitól (DTT) (Invitrogen).
- Fluoróforo *BigDye* 3.1 (Applied Biosystems).
- Kit de ADNasa RQ1 libre de ARN (M6101, Promega): contiene tampón 10X, ADNasa libre de ARN y solución de parada.
- Kit de ADNasa libre de ARN (AM1906, Ambion): contiene tampón 10X, ADNasa I libre de ARN y reactivo de inactivación de la ADNasa.
- Kit de análisis de la calidad del ARN (RNA 6000 Nano LabChip®, Agilent): contiene la matriz del gel, el marcador, el colorante y los soportes para el gel.
- Kit de purificación de ADN (QIAquick PCR Purification kit, Qiagen): contiene tampones de unión, lavado y elución y columna de extracción.

- Kit de retrotranscripción y amplificación (One-Step RT-PCR, Qiagen): contiene tampón con un mix de enzimas (las transcriptasas reversas OmniScript y SensiScript y la ADN polimerasa *HotStart* Taq), solución Q y dNTPs.
- Mezcla qRT-PCR iQ SYBR Green (Bio-Rad): contiene tampón con dNTPs, iTaq ADN polimerasa, MgCl₂, SYBR Green, fluoresceína y estabilizadores.
- Kit para qRT-PCR (QuantiTect SYBR Green PCR kit, Qiagen): contiene ADN polimerasa HotStart Taq y cebadores específicos (300 nM).
- MOPS (M-3183, Sigma).
- Patrón de pesos moleculares de ADN (70539, Novogen).
- Retrotranscriptasa MultiScribe (Invitrogen).
- Retrotranscriptasa SuperScript (Invitrogen).
- RNase ZAP (R-2020, Sigma).
- RNAsin (N2511, Promega).
- Tampón de carga 6X (69180, Novogen).
- Tampón de secuenciación 5x BigDye Terminator v1.1/3.1 (Applied Biosystems).
- Trizol (TRI[®] Reagent, T-9424, Sigma).

c) Cultivos.

- Ácido ascórbico (A-5960, Sigma).
- Ácido N-2-hidroxietilpiperacina-N'-2'-etanosulfónico (HEPES) (H-3375, Sigma).
- Cloruro cálcico dihidratado (CaCl₂ · 2H₂O) (2083, Merck).
- Cloruro potásico (KCl) (P-3911, Sigma).
- Glucosa (152527, ICN Biomedicals).
- Hormona adrenocorticotropa humana (ACTHh) (A-0423, Sigma).
- Hormona adrenocorticotropa porcina (ACTHp) (A-6303, Sigma).
- Luzindol (L-2407, Sigma).
- Medio mínimo esencial de Dulbecco (DMEM) (D-1152, Sigma).
- Melatonina (M-5250, Sigma).

d) HPLC.

- Acetonitrilo (781881, Panreac).
- Ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC) (850217, Sigma).
- Ácido 5-hidroxiindol acético (5-HIAA) (H-8876, Sigma).
- Adrenalina (E-4250, Sigma).
- Agua ultra pura (Milli-Q).
- Dopamina (H-8502, Sigma).
- L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA) (D-9628).

- Noradrenalina (74480, Sigma).
- Octanosulfonato sódico (O-0133, Sigma).
- Serotonina (H-9523, Sigma).

e) Radioinmunoensayo (RIA).

- IgG de conejo (IgG-NRS, Campro Scientific).
- IgG específica de cortisol (IgG-F-1, Campro Scientific).
- IgG específica de Ig de suero de conejo (IgG-GARGG, Campro Scientific).
- Radioisótopo de cortisol (^{125}I -cortisol, NEX435010UC, Perkin Elmer).

1.2.2. Kits para la valoración de metabolitos y hormonas plasmáticas.

- Kit Active Cortisol DSL-2000 (Diagnostic System Laboratories Inc.): contiene cortisol estándar, ^{125}I -cortisol-PEG y anticuerpo anti-cortisol.
- Cortisol ELISA DE 1887 (Demeditec): contiene placas con pocillos recubiertos con cortisol conjugado con peroxidasa de rábano, cortisol estándar, anticuerpo anti-cortisol, tetrametilbencidina (TMB) y solución de parada.
- Glucosa-TR (Spinreact): contiene tampón TRIS pH 7,4, 4-aminofenazona (4-AF), fenol, glucosa oxidasa (GOD) y peroxidasa (POD).
- Lactato (Spinreact): contiene tampón PIPES pH 7,5, 4-aminofenazona (4-AF), 4-clorofenol, lactato oxidasa (LO) y peroxidasa (POD).

1.3. MANTENIMIENTO DE LOS PECES.

Para la realización de los experimentos de la presente Tesis Doctoral se han utilizado dos especies de peces teleósteos: el carpín dorado (*Carassius auratus*) y la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*).

1.3.1. Carpín (*Carassius auratus*).

Los ejemplares de *C. auratus* proceden de establecimientos comerciales especializados de Madrid. En el laboratorio, los carpines se mantuvieron en una cámara de aclimatación en acuarios de 60 l (4,5 g/l), dotados de sistemas de aireación y filtración continua de agua, que era renovada en su totalidad con una periodicidad mensual. La filtración se realiza mediante filtros de carbón activo (Filtro max 1, ICA) que se limpian semanalmente. Para evitar posibles infecciones fúngicas o bacterianas, así como afecciones ectoparasitarias, se añadió a los acuarios sal común al 0,3‰.

La temperatura media del agua se controló diariamente ($21 \pm 2^\circ\text{C}$), así como las temperaturas máxima y mínima del laboratorio. El fotoperiodo (12 horas de luz y 12

horas de oscuridad, 12L:12D, encendido de las luces a las 7:00 h) era controlado automáticamente.

Durante los periodos de mantenimiento y en las fases experimentales en las que no se valoró la ingesta, la alimentación de los carpines se realizó a base de pienso laminado comercial para peces de estanque (Bio Flakes, SeraPond), cuya composición es:

- proteína (21%).
- grasa (2,7%).
- fibra (0,5%).
- ceniza (4,1%).
- humedad (6,7%).
- minerales, vitaminas (A, D₃, E, B₁, B₂ y C), antioxidantes y colorantes (65%).

La comida (1% del peso corporal, pc) se administró diariamente 3 horas después del encendido de las luces mediante un sistema de comederos automáticos (Eheim).

Los carpines se aclimataron a estas condiciones de laboratorio durante al menos dos semanas antes de realizar cada experimento, mostrando un patrón normal de alimentación y actividad locomotora durante dicho periodo.

1.3.2. Trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*)

Las truchas utilizadas en esta Tesis fueron suministradas por la Piscifactoría Cien Fuentes (Guadalajara, España), y mantenidas en un estanque de 5.500 l (2,7 g/l, aproximadamente) en las instalaciones de la Escuela Técnica Superior de Ingeniería de Montes de la Universidad Politécnica de Madrid. Los tanques se limpiaban cada 10 días. El agua se filtraba continuamente por medio de un filtro biológico de arena. El flujo de agua era de 1.000 l/h.

Al tratarse de una instalación exterior dotada de una entrada continua de agua de manantial, las truchas estaban expuestas a las fluctuaciones naturales de fotoperiodo y temperatura. Las truchas eran alimentadas diariamente durante 5 días a la semana al 1% pc con un pienso granulado comercial (EFICO alpha 352, Biomar, España) a las 9:00 h. La composición del pienso es:

- proteína bruta (46%).
- aceites y grasas brutas (12%).
- ceniza bruta (6,4%).
- fibra bruta (4%).
- fósforo (1%).
- oligoelementos, vitaminas, antioxidantes y colorantes (30,6%).

Estas condiciones de mantenimiento se mantuvieron durante al menos dos semanas antes de comenzar cada experimento.

2. MÉTODOS.

Todos los protocolos de mantenimiento y experimentación utilizados en la presente Tesis Doctoral han sido aprobados por el Comité de Experimentación Animal de la Universidad Complutense de Madrid. Asimismo, cumplen la normativa española vigente durante su desarrollo, según el Real Decreto 1201/2005 sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos y la Ley 32/2007 para el cuidado de animales, en su explotación, transporte, experimentación y sacrificio. A nivel europeo, todos nuestros protocolos cumplen la Directiva 2010/G3/UE para la protección de animales utilizados para fines científicos.

2.1. ANESTESIA Y SACRIFICIO.

Para minimizar el estrés que implica la manipulación de los animales, éstos fueron **anestesiados** antes de realizar cualquier práctica (excepto en aquellos diseños en los que se incluye un protocolo de exposición a estrés). En los experimentos de la presente Tesis Doctoral se utilizaron dos procedimientos con fines anestésicos: el baño en agua-hielo (4°C) y la tricaína-metanosulfonato (MS-222, 1:10.000 p/v). Ambos son anestésicos habitualmente utilizados en experimentación con peces y otros animales acuáticos, por la sencillez de su uso y por no alterar parámetros como la ingestión de alimento (De Pedro *et al.*, 1993; Sink *et al.*, 2007). En esta Tesis Doctoral, hemos realizado un ensayo preliminar para comprobar que ninguno de los dos anestésicos modifica los niveles plasmáticos de cortisol en el carpín. Los resultados demostraron que no existen diferencias significativas en los niveles de cortisol circulante entre los peces inmersos en un baño de agua-hielo ($39,36 \pm 9,24$ ng/ml, $n=7$) y los carpines anestesiados con MS-222 ($35,16 \pm 12,01$ ng/ml, $n=6$), por lo que consideramos válida la utilización de ambos anestésicos.

El procedimiento general de anestesia consistió en la inmersión de los peces en el anestésico correspondiente durante 2-4 min. Los animales se consideran anestesiados cuando muestran pérdida del equilibrio y la consiguiente detención de la actividad natatoria, y movimientos respiratorios operculares y bucales más lentos de lo habitual.

El método de **sacrificio** de los peces fue diferente en función de la especie y de los requerimientos experimentales: en el carpín se realizó por decapitación, mientras que en la trucha, por su mayor tamaño, se llevó a cabo mediante un golpe seco en la intersección del cráneo con la espina dorsal. En los experimentos en los que se realizó

el cultivo de la región cefálica del riñón del carpín el método de sacrificio utilizado fue una sobredosis de 2-fenoxietanol (1:1.000 v/v). Este método ha sido utilizado en numerosos estudios con teleósteos (Metz *et al.*, 2004, 2005; Aluru y Vijayan, 2006). El 2-fenoxietanol es un agente neurotóxico potente, y a dosis eutanásicas, tiene una acción muy rápida y gran efectividad. Cuando el pez se sumerge en agua conteniendo 2-fenoxietanol, se observa una pérdida casi inmediata del equilibrio, y la total parálisis de los movimientos operculares y bucales en 1-2 min.

2.2. TÉCNICAS DE INYECCIÓN.

2.2.1. Inyecciones intracerebroventriculares (ICV).

Las inyecciones se llevaron a cabo utilizando una microjeringa Hamilton de 5 µl a la que se adapta, a través de una cánula de 0,5 mm de diámetro interno, una aguja de 0,3 mm. El sistema se ceba con agua destilada, con ayuda de una microjeringa Hamilton de 50 µl, para evitar la contaminación de la microjeringa de 5 µl con la sustancia a inyectar y, tras la formación de una pequeña burbuja de aire en la cánula, ésta se carga con el fármaco o la solución salina, según se trate de individuos tratados o controles. La burbuja de aire evita la mezcla entre la solución a inyectar y el agua destilada con la que se ceba el sistema, y además permite controlar el volumen inyectado (1 µl) mediante la observación de su desplazamiento.

La técnica de inyección ICV utilizada es la descrita por Kavaliers (1989), con alguna modificación puesta a punto en nuestro laboratorio (De Pedro *et al.*, 1993). Las inyecciones se realizaron en peces anestesiados y situados sobre un molde de parafina adaptado a la forma y tamaño del animal, facilitando así su manejo. La aguja se introduce, con la ayuda de una lupa binocular, con una inclinación de 70° y una profundidad de 2-3 mm (según el tamaño del pez) a través de la línea de inserción central que forman los huesos parietales y frontales. Esta zona constituye un punto de menor resistencia que el resto de las estructuras óseas que cubren el encéfalo, permitiendo el acceso al sistema ventricular a la altura del diencéfalo (III ventrículo).

2.2.2. Inyecciones intraperitoneales (IP).

Las inyecciones IP fueron realizadas con jeringuillas de plástico de 1 ml y agujas de 0,5 mm de diámetro. Los peces son colocados sobre un molde de parafina en posición ventral. La aguja se introduce a la altura de la línea media ventral inmediatamente posterior a las aletas pelvianas, con una profundidad de aproximadamente 5 mm. Los peces se pesan inmediatamente antes de ser inyectados con el fin de ajustar el volumen de inyección al peso del animal (10 µl/g pc).

2.2.3. Preparación de las soluciones inyectables.

- Solución salina de teleósteos:

- NaCl 0,6 g/100 ml
- NaHCO₃ 15,8 mg/100 ml

Cuando las sales se han disuelto completamente, se ajusta el pH a 7,2 con HCl 1N. Se conserva a 4°C hasta un máximo de 2 meses.

- Melatonina (MEL):

La MEL comercial se disolvió en etanol absoluto para obtener la solución más concentrada (80 mM), que se conservó a -20°C. A partir de ella, se prepararon diariamente las soluciones para inyectar mediante una dilución en solución salina de teleósteos. La concentración final de etanol en las soluciones inyectadas de MEL y en su correspondiente control fue $\leq 5\%$.

- Factor liberador de corticotropina (CRF) y hormona adrenocorticotropa (ACTH):

Ambas hormonas de origen comercial se disolvieron en agua destilada, obteniendo las soluciones concentradas correspondientes:

- CRF humano (CRFh): 5 µg/µl.
- ACTH porcina (ACTHp): 1 mM.

Estas soluciones se alicuotaron y conservaron a -20°C hasta su utilización posterior. Las soluciones para inyectar se prepararon por dilución de éstas en solución salina de teleósteos.

2.2.4. Preparación de los fármacos y hormonas añadidos al medio de cultivo.

- MEL:

La MEL comercial se disolvió en etanol absoluto para obtener la solución más concentrada (80 mM), que se conservó a -20°C. A partir de ella, las soluciones de ensayo se prepararon inmediatamente antes de su adición al cultivo mediante una dilución en el medio de incubación. La concentración final de etanol en las soluciones de MEL y en su correspondiente control fue $\leq 0,01\%$.

- Luzindol (LUZ):

El LUZ comercial se disolvió en etanol absoluto para obtener la solución más concentrada (30 mM), que se conservó a -80°C. A partir de ella, las soluciones de ensayo se prepararon inmediatamente antes de su adición al cultivo mediante una dilución en el medio de incubación. La concentración final de etanol en las soluciones de LUZ y en su correspondiente control fue $\leq 0,01\%$.

- ACTHp y ACTH humana (ACTHh):

La hormona comercial se disolvió en agua destilada, obteniendo una solución concentrada de 1 mM para la ACTHp y 0,1 mM para la ACTHh. Esta solución se alicuotó y se conservó a -20°C, obteniéndose a partir de ella las soluciones para añadir al cultivo mediante diluciones en el medio de incubación.

Para el cultivo de tejido interrenal de trucha se utilizó la ACTHp, mientras que para el cultivo del tejido de carpín se utilizó la ACTHh.

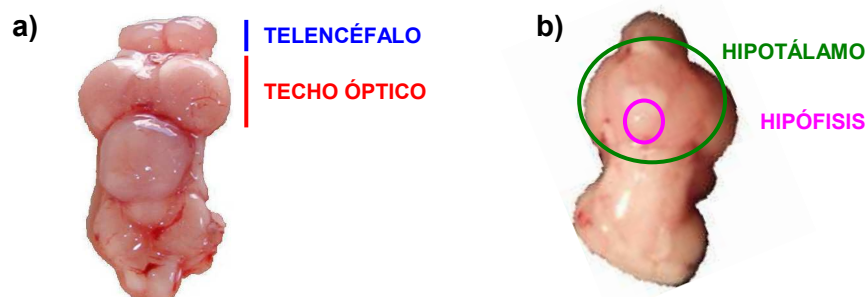
2.3. OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS.

2.3.1. Sangre.

La sangre se extrajo por punción de la vena caudal de animales anestesiados, inmediatamente por debajo de la línea lateral y a 1-2 cm de la base de la aleta caudal. Se utilizaron jeringuillas de plástico de 1 ml y agujas Microlance de 0,5 mm de diámetro previamente heparinizadas (heparina al 1%). La sangre se recogió en tubos Eppendorf, también heparinizados, mantenidos en un baño de agua-hielo. Inmediatamente después de la extracción, la sangre se centrifugó a 6.000 rpm durante 4 min a 4°C para obtener el plasma, que se conservó a -20°C hasta su utilización para la determinación de los niveles plasmáticos de cortisol, glucosa y lactato.

2.3.2. Tejidos centrales.

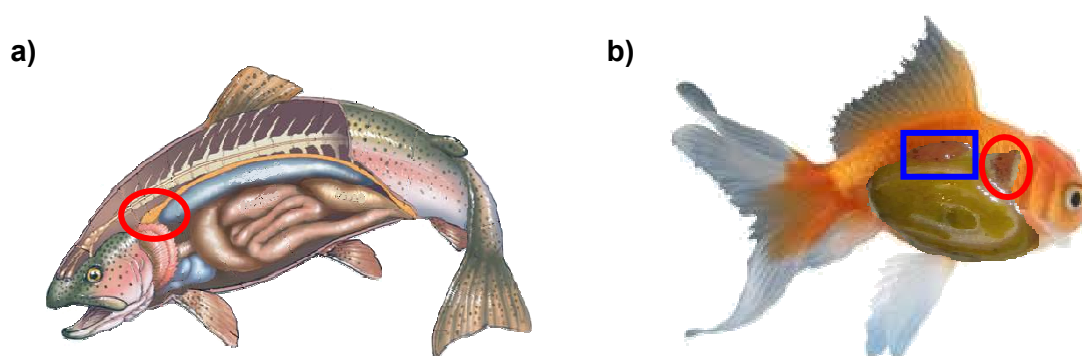
Tras la decapitación, se procedió a la extracción del encéfalo mediante una sección de las uniones óseas del cráneo y, con ayuda de una lupa binocular, se realizó la disección de las siguientes regiones: telencéfalo, techo óptico, hipotálamo e hipófisis, dependiendo del diseño (Esquema 1). Una vez extraídos, los tejidos se introdujeron en tubos estériles y se congelaron inmediatamente en hielo seco o nitrógeno líquido, almacenándose a -80°C hasta su utilización para la cuantificación de monoaminas (ver apartado 2.5.7.) o en técnicas de biología molecular (ver apartado 2.5.8.).



Esquema 1. Vista a) dorsal y b) ventral del encéfalo de carpín, mostrando las regiones diseccionadas en los diferentes diseños de la presente Memoria.

2.3.3. Riñón.

El riñón del carpín se encuentra distribuido en dos zonas: la región cefálica y la región posterior. La región cefálica del riñón se sitúa en la zona dorsorrostral del pez, detrás de los arcos branquiales, y sobre la pared peritoneal (Esquema 2). Previamente a la disección de este tejido, se extrajo la mayor cantidad de sangre posible, en animales anestesiados, para reducir la irrigación en la zona a muestrear. El acceso a la región cefálica del riñón se realizó mediante un corte longitudinal de la zona ventral del animal, separando el resto de vísceras para facilitar la visibilidad. Se seccionó la cápsula de tejido conjuntivo que rodea a la región cefálica del riñón con la ayuda de una hoja de bisturí estéril y se procedió a la extracción. Inmediatamente, el tejido se preparó apropiadamente para su utilización en un cultivo organotípico (ver apartado 2.4.), o bien se colocó en tubos estériles, se congeló en hielo seco o nitrógeno líquido, y se conservó a -80°C para ser utilizado posteriormente en técnicas de biología molecular (ver apartado 2.5.8.). Para facilitar la escritura y lectura de esta Memoria, en adelante nos referiremos a la región cefálica del riñón como **tejido interrenal**.



Esquema 2. Vista anatómica de la localización de la región cefálica del riñón (círculo rojo) en **a)** la trucha y **b)** el carpín. El cuadro azul indica la localización del riñón posterior en el carpín.

El riñón posterior del carpín, al que por simplificar denominaremos **riñón**, está situado en la pared visceral a ambos lados de la porción media de la espina dorsal (Esquema 2b). El acceso al órgano se realizó de la misma manera que la descrita para el tejido interrenal. Una vez extraído, el riñón se colocó en tubos estériles y se conservó a -80°C para ser utilizado posteriormente en técnicas de biología molecular (ver apartado 2.5.8.).

2.4. CULTIVOS ORGANOTÍPICOS.

Los cultivos organotípicos permiten estudiar la respuesta aislada de un órgano a un tratamiento, sin interacción con otras estructuras del organismo. El mantenimiento de los tejidos en cultivo requiere una temperatura determinada (la de aclimatación en

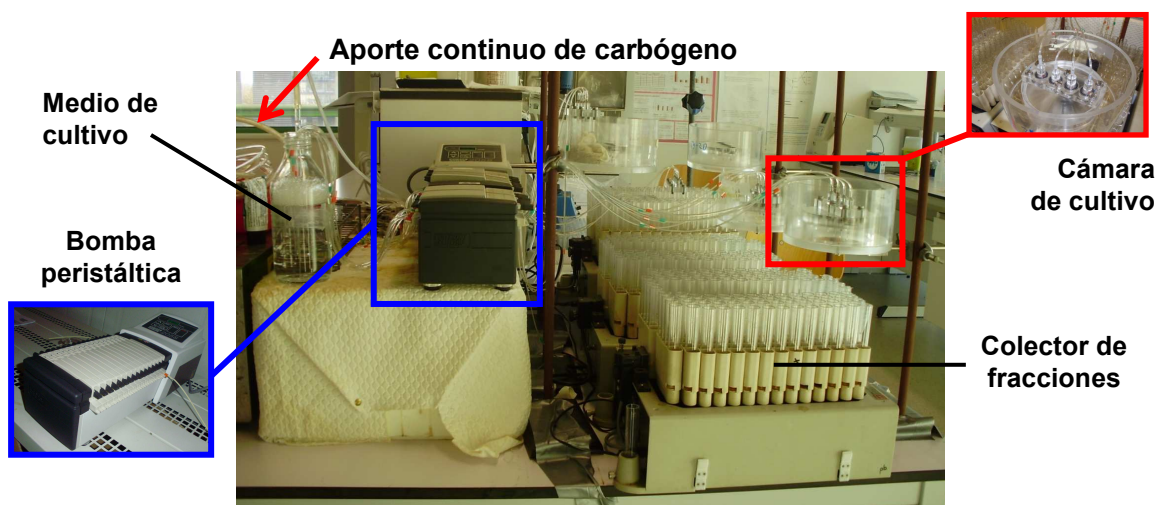
animales poiquilotermos), presencia de oxígeno y un medio de cultivo con nutrientes esenciales, isoosmótico con el medio interno del animal y un pH óptimo (mantenido con un aporte extra de CO₂). Sin embargo, presenta limitaciones respecto a otros tipos de cultivo, como el celular, debido principalmente a la dificultad para que el medio acceda a todas las células del órgano.

Con el fin de estudiar el efecto directo de diferentes hormonas y/o fármacos sobre el tejido interrenal, se pusieron a punto dos variedades diferentes de la técnica de cultivo organotípico:

- Cultivo en superfusión, que permite un seguimiento temporal preciso de la respuesta del órgano a la presencia del compuesto ensayado, mediante la recogida de fracciones de eluido en periodos de tiempo muy cortos.
- Cultivo estático, que resulta adecuado cuando se pretende conocer el efecto neto que un tratamiento produce sobre el órgano, concentrar el producto liberado, o analizar el efecto de retroalimentación de dicho producto sobre su propia síntesis y/o liberación.

2.4.1. Cultivo en superfusión.

El protocolo de cultivo seguido es el descrito por Metz y colaboradores (2005) para ensayos con el tejido interrenal de carpa (*Cyprinus carpio*). El sistema utilizado en nuestro caso para cultivar el tejido interrenal del carpín, consta de una bomba peristáltica, que impulsa a un determinado flujo el medio de cultivo (saturado con carbógeno, 95% O₂:5% CO₂) a través de una cámara donde se encuentra el tejido. El medio que eluye de la cámara es recogido durante intervalos de tiempo determinados por medio de un colector de fracciones (Esquema 3).



Esquema 3. Sistema de cultivo en superfusión utilizado para el cultivo de tejido interrenal de carpín.

a) Composición del medio.

El medio de cultivo empleado es un salino cuya osmolaridad se adaptó a la de los peces de agua dulce (265-280 mOsm/kg) (Metz *et al.*, 2005). Su composición es:

- NaCl	128 mM
- KCl	2 mM
- CaCl ₂ · 2H ₂ O	2 mM
- Glucosa	0,25 %
- BSA	0,03 %
- Ácido ascórbico	0,1 mM
- HEPES	0,015 M
pH = 7,4	

b) Procedimiento.

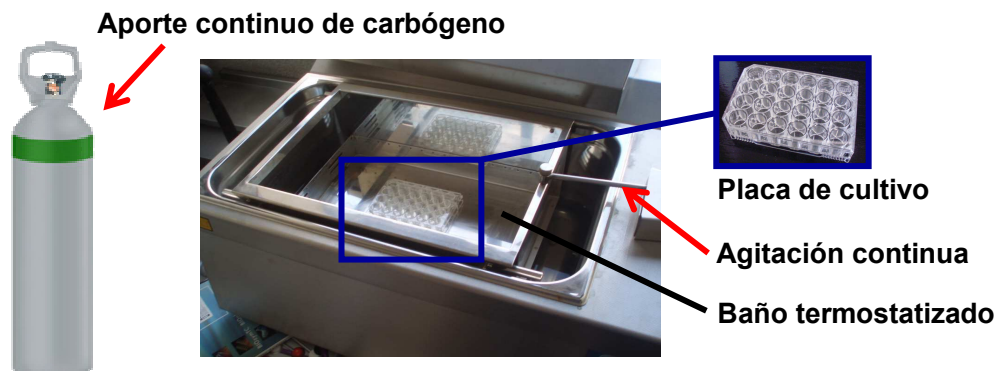
El tejido interrenal de los carpines se coloca dentro de las cámaras de cultivo sobre un filtro (para impedir que el órgano tapone el sistema). El medio de cultivo a 22°C y saturado con carbógeno, circula con un flujo constante de 30 µl/min a través de la cámara. El tejido se mantiene en estas condiciones durante 150 min (periodo de estabilización), que es el tiempo necesario para que la liberación basal de cortisol sea constante. A continuación, se añaden las diferentes hormonas al medio de cultivo durante periodos de tiempo variables que serán especificados en cada diseño experimental. El medio que eluía de la cámara se almacenó a -20°C hasta su utilización para medir los niveles de cortisol mediante un RIA (apartado 2.5.6.1.b). Se consideraron los siguientes parámetros:

- Liberación máxima de cortisol, expresada como porcentaje respecto a los niveles basales (120-150 min).
- Liberación total de cortisol, expresada como porcentaje respecto a los niveles basales (120-150 min).
- Liberación basal de cortisol en el intervalo 150-180 min, expresada como porcentaje de liberación respecto a los niveles al final del periodo de estabilización previo (150 min).
- Tiempo de liberación máxima, expresado en minutos.
- Tiempo de recuperación de los niveles basales de cortisol tras la estimulación con ACTH, expresado en minutos.

2.4.2. Cultivo estático.

Esta técnica se utilizó para el cultivo del tejido interrenal de carpín y trucha. El sistema consta de una placa de cultivo de 24 pocillos (volumen de cada pocillo: 3 ml),

situada en un baño termostatzado, con aporte continuo de carbógeno y agitación constante (Esquema 4).



Esquema 4. Sistema de cultivo estático utilizado para el cultivo del tejido interrenal de carpín y trucha.

a) Composición del medio.

El medio de cultivo utilizado para el cultivo del tejido interrenal del carpín es el mismo salino que el empleado para el cultivo en superfusión (apartado 2.4.1.).

Por otra parte, el tejido interrenal de trucha se incubó con medio mínimo esencial de Dulbecco (DMEM), compuesto por:

	<u>g/l</u>		<u>g/l</u>
L-Arginina · HCl	0,084	Niacinamida	0,004
L-Cisteína · 2HCl	0,063	Ácido D-pantoténico hemicalcio	0,004
Glicina	0,030	Piridoxal · HCl	0,004
L-Histidina · HCl · H ₂ O	0,042	Riboflavina	0,0004
L-Isoleucina	0,105	Tiamina · HCl	0,004
L-Leucina	0,105	Cloruro cálcico (anhidro)	0,2
L-Lisina · HCl	0,146	Nitrato férrico · 9H ₂ O	0,0001
L-Metionina	0,03	Sulfato de magnesio (anhidro)	0,098
L-Fenilalanina	0,066	Cloruro potásico	0,4
L-Serina	0,042	Cloruro sódico	6,4
L-Treonina	0,095	Fosfato sódico monobásico	
L-Triptófano	0,016	(anhidro)	0,109
L-Tirosina · 2Na · 2H ₂ O	0,104	D (+) Glucosa	1,0
L-Valina	0,094	L-Glutamina	0,584
Cloruro de colina	0,004	Piruvato sódico	0,11
Ácido fólico	0,004	Rojo fenol	0,015
Mio-inositol	0,007	pH=7,4	

El medio de cultivo se preparó según indicaciones de la casa comercial, adaptando su osmolaridad a la de los peces de agua dulce añadiendo 1 ml de agua por cada 4 ml de medio.

b) Procedimiento.

El protocolo seguido es el mismo que el descrito por Aluru y Vijayan (2008), con ligeras modificaciones. Una vez extraído el tejido interrenal, éste se colocó en una placa Petri que contenía el medio de cultivo, previamente atemperado a 15°C para el cultivo de trucha y a 22°C para el cultivo de carpín, donde se troceó en fragmentos de 1 mm³ aproximadamente. Estos fragmentos se distribuyeron de manera homogénea en 8 pocillos de la placa de cultivo que contenían el medio de incubación. El tejido se conservó en estas condiciones durante un periodo de estabilización de 2 horas (con renovación del medio de cultivo pasada 1 hora), que es el periodo necesario para que la liberación basal de cortisol se mantenga constante. Tras la estabilización, se recoge todo el volumen de medio de cada pocillo, y se repone con medio fresco solo o conteniendo las diferentes hormonas y/o fármacos a ensayar.

A diferentes tiempos, que se especificarán en cada diseño, se recogió la totalidad del volumen de medio de cultivo de los pocillos. Al final del experimento se recogieron los fragmentos de tejido y se pesaron. Las muestras de medio de cultivo se conservaron a -20°C hasta su utilización para cuantificar los niveles de cortisol liberado mediante un ELISA (apartado 2.5.6.2.). Los valores obtenidos se relativizaron por su correspondiente control (incubado con medio solo) o por la liberación en el periodo de estabilización (60-120 min) para normalizar.

2.5. TÉCNICAS ANALÍTICAS.

2.5.1. Cuantificación de la ingestión de alimento.

Para la valoración de la ingesta los peces son alimentados durante al menos 15 días con pienso granulado (Sera Biogram). Este tipo de pienso es idóneo para evaluar la ingesta, al mostrar un alto grado de flotación, lo que facilita su recogida.

La composición del alimento suministrado a los peces es:

- proteínas (25,9%).
- grasa (5,2%).
- fibra (4,1%).
- ceniza (6,8%).
- humedad (6,8%).
- minerales, vitaminas (A, D₃, E, B₁, B₂ y C), antioxidantes y colorantes (51,2%).

En todos los diseños experimentales en que se valora la ingesta, el alimento (3% pc) fue suministrado inmediatamente después de las inyecciones a cada uno de los acuarios individuales de 5 l. Durante las 2 horas en que los animales tienen libre acceso a la comida se controló que ésta no fuese limitante, reponiéndose en caso de que fuese ingerida totalmente. Finalizadas las 2 horas, los gránulos de comida remanentes se recogieron con una red fina, se colocaron en cestillos de papel de aluminio previamente pesados y se introdujeron en una estufa a 40°C hasta su completa desecación. La ingesta se calculó según la siguiente fórmula:

$$I = P_i - (P_f \times F)$$

I = ingesta.

P_i = peso seco inicial de la comida.

P_f = peso seco final de la comida remanente en el agua transcurrido el periodo de ingesta (2 horas).

F = factor de corrección. Durante el tiempo que el alimento permanece en el agua se produce una cierta disolución del mismo, hecho que se corrige mediante este factor, F , calculado de la siguiente manera:

- Se añade en 10 acuarios individuales una cantidad conocida de comida (P_i).
- Se recoge la comida remanente transcurridas 2 horas y se coloca en cestillos individuales previamente pesados.
- El contenido de los cestillos se deseca en estufa y se pesa (P_f).
- $F = P_i / P_f$, $F (2 h) = 1,16 \pm 0,01$ ($n = 10$).

En estas condiciones, F representa la reducción de peso de la comida producida por el efecto de disolución, tras permanecer en el agua durante 2 horas.

2.5.2. Valoración de la actividad locomotora.

Para cuantificar la actividad locomotora se utilizó un sistema similar al utilizado por Sánchez-Vázquez y colaboradores (1996). Se trata de un actímetro compuesto por unas fotocélulas infrarrojas, un *interface* común para todas ellas y un *software* informático, el programa Adq16 (Micronec).

En los experimentos en los que se cuantificó la actividad locomotora de los peces mantenidos en grupo, se utilizaron acuarios de 60 l de volumen, con 2 fotocélulas adheridas a una de sus paredes: una aproximadamente 11 cm sobre el fondo del acuario y a 2 cm de la esquina (situada bajo el comedero), y la otra a 1 cm del fondo y a 15 cm de la esquina del acuario. Alternativamente, se utilizaron 3 fotocélulas: una situada a 11 cm sobre el fondo del acuario y a 3 cm de la esquina

III. MATERIALES Y MÉTODOS

(situada bajo el comedero), otra a 7 cm del fondo y a 29 cm de la esquina y la otra situada a 3 cm del fondo y a 15 cm de la esquina del acuario (Fotografía 1).



Fotografía 1. Posición de las fotocélulas utilizadas para el registro de la actividad locomotora de carpines mantenidos en grupo.

Para cuantificar la actividad locomotora individual, se utilizaron acuarios de 5 l con una fotocélula situada en posición central en una de las caras laterales del acuario (Fotografía 2).



Fotografía 2. Posición de la fotocélula utilizada para el registro de actividad locomotora individual.

Las fotocélulas emiten un haz de luz infrarroja continua. Cada vez que un pez cruza el haz se interrumpe su trayectoria, y esta señal es recogida en forma de pulso en el *software* de adquisición de datos Adq16 vía *interface*. De esta manera, se obtiene el registro de la actividad locomotora a lo largo de ciclos completos de 24 horas, que se puede prolongar durante semanas.

Con el fin de no interferir en el comportamiento de los peces durante el desarrollo de los experimentos, se prestó especial atención para minimizar las entradas y salidas de la habitación, procurando no alterar a los animales. Asimismo, se evitaron los estímulos visuales cubriendo las paredes de todos los acuarios con papel de filtro.

Los valores numéricos obtenidos en las tablas con el programa Adq16 se trasladaron al programa *Microsoft Excel* para proceder a su análisis. Se estudiaron los siguientes parámetros:

- Actividad diaria total, suma de los valores obtenidos cada 10 min a lo largo de un ciclo completo de 24 horas.
- Actividad nocturna, suma de los valores recogidos cada 10 min durante la escotofase (real o subjetiva).
- Actividad diurna, suma de los valores recogidos cada 10 min durante la fotofase (real o subjetiva).
- Actividad anticipatoria al alimento (FAA), definida como el incremento de actividad locomotora mostrado por el animal durante las 2-3 horas previas a la hora habitual de administración del alimento (Sánchez-Vázquez y Madrid, 2001). En los experimentos de esta Memoria, consideramos FAA a la actividad registrada durante las 3 horas previas a la administración de la comida.

Los datos de actividad locomotora se representaron como valores absolutos en un intervalo de tiempo determinado o como porcentaje respecto a la actividad desarrollada durante el mismo periodo de tiempo en el día anterior.

Adicionalmente, los datos fueron analizados con un *software* de cronobiología, *El Temps*[®], y se representaron en dos formas diferentes según el diseño:

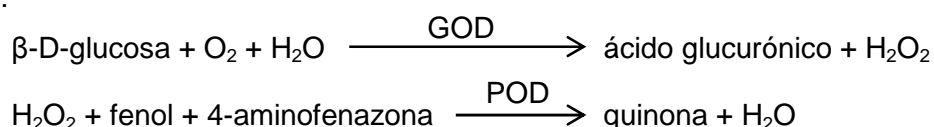
- Actograma: representación gráfica de los valores de actividad locomotora, en cuyo eje de ordenadas se representan los valores de actividad en cada ciclo y en el eje de abscisas las horas del día (Díez-Noguera, 2006). Los actogramas se han representado como gráfica duplicada (*double plot*), para una mejor visualización.
- Periodograma: representación gráfica que permite identificar el periodo de un determinado ritmo, y calcula su significación estadística. El eje de abscisas representa el periodo del ritmo, generalmente en horas, y el eje de ordenadas una variable que indica el “grado de presencia” del periodo en la serie temporal y que, en nuestro caso, se representa como porcentaje de varianza (%V). La presencia de picos en la gráfica permite conocer el periodo del ritmo que se encuentra en la serie temporal. Además, en el periodograma se indica un umbral que representa el nivel de significación del periodo ($p < 0,05$), de modo que únicamente se consideran significativos los picos que superen dicho umbral (Díez-Noguera, 2006). Cuanto mayor es el pico del periodo, más robusto es el ritmo.

2.5.3. Determinación de los niveles plasmáticos de glucosa.

Los niveles plasmáticos de glucosa se determinaron mediante un método enzimático colorimétrico, utilizando el kit comercial Glucosa-TR (Spinreact).

a) Base teórica del método.

La glucosa oxidasa (GOD) cataliza la oxidación de glucosa a ácido glucurónico. El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) producido se detecta mediante un aceptor cromogénico de oxígeno, la fenol-4-aminofenazona en presencia de peroxidasa (POD):



La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de glucosa presente en la muestra ensayada.

b) Reactivos.

- Reactivo 1 (R1):

- | | |
|----------------------|------------|
| • Tampón TRIS pH 7,4 | 92 mmol/l |
| • Fenol | 0,3 mmol/l |

- Reactivo 2 (R2):

- | | |
|-------------------|------------|
| • Glucosa oxidasa | 15.000 U/l |
| • Peroxidasa | 1.000 U/l |
| • 4-aminofenazona | 2,6 mmol/l |

- Estándar de glucosa 100 mg/dl

c) Procedimiento.

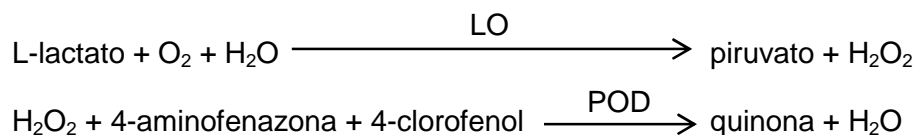
- Preparar la solución reactiva mezclando el contenido de R1 con R2.
- Añadir 1 ml de la solución reactiva a 10 μ l de muestra y a cada punto de la curva estándar (0,25-2 mg/ml) preparada a partir del estándar de glucosa.
- Agitar e incubar durante 10 min a 37°C.
- Lectura de la absorbancia a 505 nm.
- Las determinaciones se realizaron por duplicado y se expresaron en mg/ml.

2.5.4. Determinación de los niveles plasmáticos de lactato.

Para determinar los niveles plasmáticos de lactato se utilizó el kit comercial LO-POD (Spinreact), basado en un método enzimático colorimétrico.

a) Base teórica del método.

El lactato es oxidado por la enzima lactato oxidasa (LO) a piruvato y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) que en presencia de peroxidasa (POD), 4-aminofenazona y 4-clorofenol forma un compuesto de quinona de color rojo:



La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de lactato presente en la muestra ensayada.

b) Reactivos.

- Reactivo 1 (R1):
 - PIPES pH 7,5 50 mmol/l
 - 4-clorofenol 0,3 mmol/l
- Reactivo 2 (R2):
 - Lactato oxidasa 800 U/l
 - Peroxidasa 2.000 U/l
 - 4-aminofenazona 0,4 mmol/l
- Estándar de lactato 10 mg/dl

c) Procedimiento.

- Preparar la solución reactiva mezclando 10 ml de R1 con R2.
- Añadir 1 ml de la solución reactiva a 10 µl de muestra y a cada punto de la curva estándar (2,5-80 mg/dl) preparada a partir del estándar de lactato.
- Agitar e incubar durante 5 min a 37°C.
- Lectura de la absorbancia a 505 nm.
- Las determinaciones se realizaron por duplicado y se expresaron en mg/dl.

2.5.5. Determinación de proteínas.**a) Base teórica del método.**

Para la cuantificación del contenido proteico de las muestras se llevó a cabo un método colorimétrico descrito por Lowry y colaboradores (1951). En una primera etapa se lleva a cabo la reacción del Biuret, mediante la cual el cobre se une a los enlaces peptídicos gracias a la disposición de las cadenas laterales, consiguiendo la extensión de las proteínas. Esta reacción es poco sensible, lo que mejora al tratar con el reactivo

III. MATERIALES Y MÉTODOS

de Folin-Ciocalteu (molibdato túngstico), que se reduce al interaccionar con el grupo alcohol de los residuos de tirosina de las proteínas.

b) Reactivos.

- Tartrato Na-K (2%)
- Sulfato cúprico (1%)
- Solución B:
 - NaOH 1 g
 - Na₂CO₃ 5 g
 - H₂O 250 ml
- Solución C:
 - Sulfato cúprico (1%) 1 ml
 - Tartrato Na-K (2%) 1 ml
 - Solución B 100 ml

c) Procedimiento.

- Resuspender el precipitado obtenido tras la homogeneización del tejido en 100 µl de NaOH 0,1 N.
- Pipetear el homogeneizado (5 µl para techo óptico, 2 µl para telencéfalo).
- Pipetear los diferentes volúmenes del estándar (BSA) para realizar la curva estándar (0,5-30 µg).
- Rellenar con agua destilada hasta 25 µl.
- Añadir 250 µl de solución C, agitar e incubar 15 min a 30°C.
- Añadir 25 µl de una mezcla de reactivo de Folin:H₂O (1:1).
- Agitar e incubar 30 min a 30°C.
- Lectura de la absorbancia a 500 nm.
- Las determinaciones se realizaron por duplicado y se expresaron en µg.

2.5.6. Determinación de los niveles de cortisol.

En los experimentos de esta Memoria se han utilizado dos procedimientos diferentes para cuantificar los niveles de cortisol: el radioinmunoensayo (RIA) y el enzimoimmunoensayo (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*, ELISA).

2.5.6.1. RIA.

a) Principios generales de la técnica.

El RIA se basa en la competición que se establece entre un antígeno sin marcar u hormona fría (bien el estándar o bien la hormona presente en la muestra) y

una cantidad constante de ese mismo antígeno marcado con un isótopo radiactivo (en este caso ^{125}I) para unirse a una cantidad limitada de anticuerpo específico (anticuerpo primario) para dicho compuesto. La incubación de una mezcla de los antígenos frío y marcado en presencia del anticuerpo primario permite que se establezca un equilibrio químico entre las formas unida y libre del antígeno. La afinidad de ambos por el anticuerpo es la misma, por lo que la cantidad de antígeno marcado que se puede unir al anticuerpo dependerá de la cantidad de hormona fría presente en la muestra. Al aumentar la concentración de compuesto frío, la cantidad de antígeno marcado capaz de unirse al anticuerpo primario disminuye, por lo que el valor del marcaje final será inversamente proporcional a la cantidad de compuesto frío. Midiendo la cantidad de compuesto marcado que se une al anticuerpo en presencia de concentraciones crecientes y conocidas del estándar se puede construir una curva a partir de la cual determinar la concentración de compuesto frío presente en la muestra a analizar. Para poder llevar a cabo una cuantificación correcta, es necesario poder separar de forma fiable las fracciones libre y unida del marcador, lo que se consigue precipitando los complejos antígeno-anticuerpo con polietilenglicol (PEG) y/o con un segundo anticuerpo que reconoce las inmunoglobulinas de la especie animal productora del primer anticuerpo y eliminando la fracción libre del compuesto.

En cada ensayo, además de una curva estándar, se incluyen 3 tipos de tubos más: T, para medir las cuentas totales (solo contienen el antígeno marcado); NSB (*non specific binding*), para cuantificar la unión inespecífica (contienen todos los reactivos excepto el anticuerpo primario); B_0 , para valorar la unión máxima del antígeno marcado al anticuerpo (contienen todos los componentes, excepto el antígeno frío; corresponde al estándar 0).

En la presente Tesis Doctoral hemos utilizado 2 protocolos de RIA diferentes:

- El descrito por Metz y colaboradores (2005) para cuantificar los niveles de cortisol en medio de cultivo eluído de un cultivo en superfusión de tejido interrenal de carpín.
- El kit comercial Active Cortisol DSL-2000 para valorar los niveles de cortisol en plasma de carpín en experimentos *in vivo*.

b) RIA: protocolo descrito por Metz y colaboradores (2005).

Este método ha sido utilizado previamente para muestras de cultivo de tejido interrenal de carpa cultivado con el mismo medio que el empleado en nuestros experimentos.

- **Reactivos.**

- Tampón P-EDTA (en agua destilada):
 - 0,063 M Na_2HPO_4 .
 - 0,013 M EDTA- Na_2 .
 - 0,02% (p/v) NaN_3 .
- Tampón de incubación (en tampón P-EDTA):
 - 0,1% (p/v) ANS.
 - 0,1% (p/v) BGG.
- Tampón de precipitación (en tampón P-EDTA):
 - 5% (p/v) PEG.
 - 2% (p/v) BSA.
- ^{125}I -cortisol (10 μCi de actividad específica).
- Estándares de cortisol (2 - 2.048 pg/10 μl).
- Anticuerpos:
 - IgG de suero de conejo (IgG-NRS): el liofilizado comercial se reconstituye en 1 ml de agua destilada.
 - IgG específica de cortisol (IgG-F-1): el liofilizado comercial se reconstituye en 1 ml de tampón P-EDTA y 10 μl de la solución de IgG-NRS.
 - IgG específica de Ig de suero de conejo (IgG-GARGG): el liofilizado comercial se reconstituye en 2,5 ml de agua destilada.

Estas soluciones se diluyeron 1:400 (IgG-NRS y IgG-F-1) y 1:160 (IgG-GARGG) en tampón P-EDTA antes de añadirlas a las muestras.

- **Procedimiento.**

Día 1:

- Pipetear 10 μl de las muestras y de cada una de las concentraciones de la curva estándar.
- Añadir 100 μl de IgG-NRS a todos los tubos excepto a los T.
- Añadir 100 μl de IgG-F-1 a todos los tubos excepto a los T y NSB.
- Agitar e incubar durante 4 h a 4°C.
- Añadir 100 μl de ^{125}I -cortisol, con una actividad aproximada de 3.500 cpm/100 μl , a todos los tubos.
- Añadir 100 μl de IgG-GARGG a todos los tubos excepto a los T.

Día 2:

- Añadir 1 ml de tampón de precipitación frío a todos los tubos excepto a los T.
- Centrifugar a 5.000 rpm durante 20 min a 4°C.

- Aspirar el sobrenadante, excepto en los tubos T.
- Contaje de la radiactividad del precipitado durante 1 min en un contador γ .
- Las determinaciones de la curva estándar se realizaron por triplicado y las de las muestras por duplicado. Los valores obtenidos se expresaron en pg/10 μ l.

c) Kit Active Cortisol DSL-2000.

En estudios previos de nuestro grupo de investigación se ha validado la idoneidad de este método para muestras de plasma de carpín (De Pedro *et al.*, 1997).

• **Reactivos.**

- 125 I-cortisol (<5 μ Ci de actividad específica) en tampón con PEG.
- Estándares de cortisol (0,5 - 60 μ g/dl, incluyendo el estándar 0).
- Anticuerpo anti-cortisol de conejo.

• **Procedimiento.**

- Pipetear 12,5 μ l de cada una de las concentraciones de la curva estándar y de las muestras de plasma.
- Añadir 250 μ l de 125 I-cortisol-PEG a todas las muestras.
- Añadir 250 μ l de anticuerpo anti-cortisol a todos los tubos excepto a los T y NSB.
- Agitar e incubar durante 45 min a 37°C.
- Centrifugar a 3.000 rpm durante 20 min a 4°C.
- Decantar rápidamente el sobrenadante por inversión (excepto en los tubos T), escurriendo totalmente el volumen sobre papel absorbente durante 2-3 min y absorbiendo los restos del mismo en el tubo con un hisopo.
- Contaje de la radiactividad en el precipitado durante 1 min en un contador γ .
- Las determinaciones se realizaron por duplicado y se expresaron en ng/ml.

2.5.6.2. ELISA.

La determinación cuantitativa de cortisol en muestras de plasma de carpín y en las muestras de medio de cultivo estático de tejido interrenal de trucha se realizó mediante el uso de un kit comercial (DE 1887, Demeditec), basado en la técnica de inmunodetección ELISA, previamente validado (Vivas, 2009).

a) Principios generales de la técnica.

La técnica de inmunodetección ELISA utilizada en el presente trabajo es un ensayo en fase sólida de inmunoadsorción unido a enzimas, según el principio de unión competitiva. Se trata de una técnica basada en la formación específica de complejos antígeno-anticuerpo, utilizando una enzima como marcador del antígeno. Este tipo de inmunoensayo consta de dos etapas. En la primera etapa el antígeno no marcado y una cantidad determinada de antígeno marcado compiten por un número fijo y limitado de sitios de unión específicos en la molécula de anticuerpo. En la segunda etapa se determina la actividad de la enzima marcadora, una vez que se ha añadido el sustrato de la reacción colorimétrica catalizada por ella.

El kit utilizado incluye unas placas cuyos pocillos están recubiertos con un anticuerpo monoclonal anti-cortisol, dirigido contra un sitio antigénico en la molécula de cortisol. Así, cuando se deposita la muestra en el pocillo, el cortisol presente compite con un conjugado cortisol-peroxidasa de rábano en la unión al anticuerpo. Después de lavar la superficie sólida, con el fin de eliminar todas las moléculas de cortisol no unidas al anticuerpo inmovilizado, se revela la presencia de cortisol marcado con peroxidasa adicionando al pocillo el sustrato de la enzima. La cantidad de conjugado de cortisol-peroxidasa unido al anticuerpo, y por tanto la actividad enzimática, es inversamente proporcional a la cantidad de cortisol presente en la muestra a analizar.

b) Reactivos.

- Placa de 96 pocillos recubiertos con el anticuerpo anti-cortisol (monoclonal).
- Conjugado enzimático (cortisol conjugado con peroxidasa de rábano).
- Estándares de cortisol (20 - 800 ng/ml, incluyendo el estándar 0).
- Solución de lavado.
- Solución sustrato (tetrametilbencidina, TMB).
- Solución de parada (H_2SO_4 , 0,5 M).

c) Procedimiento.

- Pipetear 20 μl de las muestras y de cada una de las concentraciones de la curva estándar.
- Añadir 200 μl de conjugado enzimático a cada pocillo.
- Agitar e incubar durante 60 min a 25°C.

- Decantar el sobrenadante de los pocillos por inversión y lavar 4 veces con solución de lavado diluida 1:40 (300 µl/pocillo). Eliminar con papel absorbente las gotas residuales.
- Añadir 100 µl de solución sustrato a cada pocillo.
- Incubar durante 15 min a 25°C.
- Parar la reacción añadiendo 100 µl de solución de parada a cada pocillo.
- Lectura de la absorbancia a 450 nm.
- Las determinaciones se realizaron por duplicado y se expresaron en ng/ml.

2.5.7. Valoración de monoaminas.

En esta Tesis Doctoral se cuantificó la concentración de las siguientes monoaminas: adrenalina (A), dopamina (DA), noradrenalina (NA) y serotonina (5-HT) y de sus metabolitos: ácido dihidroxifenilacético (DOPAC) y ácido 5-hidroxiindol acético (5-HIAA), así como del precursor de la DA, la L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA). Para ello, se utilizó la cromatografía líquida de alta resolución con detección electroquímica (HPLC-EC).

2.5.7.1. Principios generales de la técnica.

La técnica de HPLC utilizada para la determinación de monoaminas y sus metabolitos consiste en una cromatografía líquido-sólido de fase reversa y par iónico con detección coulométrica.

La cromatografía líquido-sólido de fase reversa implica que la fase estacionaria, sólida, es apolar y está constituida por cadenas hidrocarbonadas de distinta longitud, siendo lo más frecuente octilos, octadecilos y fenilos, ligadas químicamente a la superficie de partículas de sílice que actúan como soporte inerte. La composición de la fase móvil, líquida, depende del tipo de aminas y metabolitos que se quieran separar, si bien es polar gracias a un disolvente orgánico, el acetonitrilo. Así, la fase estacionaria presenta afinidad por la parte no polar de las moléculas en solución, mientras que la fase móvil permite que eluyan antes las sustancias polares que las no polares. Las moléculas presentes en la fase líquida tenderán a quedar retenidas más o menos en la fase estacionaria en tanto sea mayor o menor la fuerza que les una a ella. Así, cada sustancia saldrá de la columna a un tiempo determinado, lo que se conoce como tiempo de retención (t_R), característico de cada molécula y que depende de las características estructurales de cada compuesto (peso molecular, carga iónica, grupos funcionales, etc.).

La cromatografía de par iónico implica la presencia en la fase móvil de un ión de carga opuesta (contraión) a la de la muestra iónica problema (monoaminas en nuestro

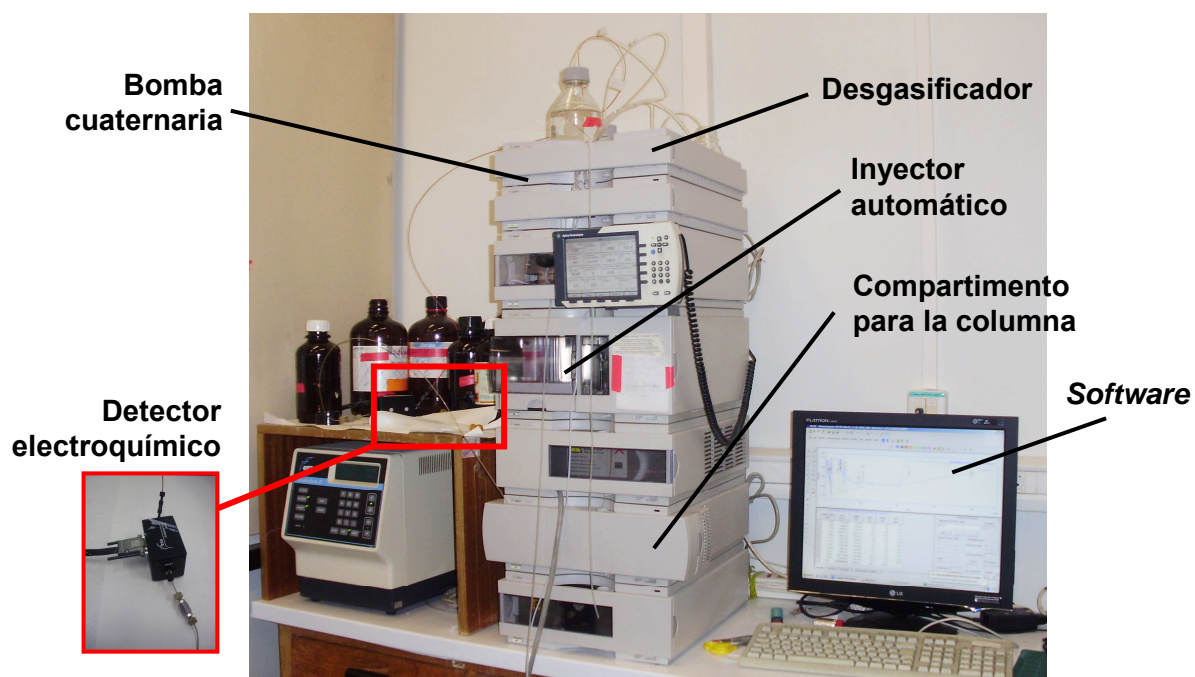
caso, cargadas positivamente a pH 2-8), por lo general de naturaleza orgánica y de elevado peso molecular, como es por ejemplo el octanosulfonato. De este modo, se conseguirá formar un par iónico con la muestra problema, cuya carga se neutralizará y por ello podrá solubilizarse en la fase orgánica (fuerza de disolución). Además, se consigue aumentar el tiempo de retención de las monoaminas, impidiendo que eluyan en el frente de inyección.

La detección electroquímica utilizada en los análisis de esta Memoria se basa en la capacidad de los solutos para oxidarse o reducirse a su paso por un electrodo al que se le aplica un potencial determinado en función de las características del soluto. Las monoaminas, gracias a sus grupos hidroxilo, pueden ser oxidadas fácilmente mediante la aplicación de un potencial positivo, pasando a derivados ortoquinonas con liberación de 2 electrones y 2 protones. Los electrones son transferidos a un electrodo y la corriente resultante es directamente proporcional al número de moléculas que están siendo oxidadas, según la Ley de Faraday (ESA Inc., 1992). Una vez amplificada, esta corriente es enviada al *software* cromatográfico *Clarity Chromatography Station*, que proporciona un cromatograma en el cual se cuantifican los solutos según el área bajo cada pico.

La metodología de HPLC utilizada en la presente Memoria se basa en la desarrollada previamente por nuestro grupo de investigación para la cuantificación de monoaminas encefálicas de *C. auratus* (De Pedro *et al.*, 2001).

El instrumental utilizado fue:

- Bomba peristáltica cuaternaria (Agilent 1100) conectada a un desgasificador (1379A), flujo 1 ml/min, presión aproximada 90 bares.
- Inyector automático (G1329A) acoplado a un termostatzador (G1330BA).
- Columna de fase reversa con empaquetamiento de tipo C₁₈. Tamaño de partícula: 5 µm. Diámetro interno: 4,6 mm. Longitud: 125 mm (Teknokroma).
- Compartimento termostatzado para columna a 30°C (Agilent, serie 1100).
- Detector electroquímico (ESA), constituido por una célula de acondicionamiento (ESA, 5021) anterior a una célula analítica coulométrica (ESA 5011) con 2 electrodos (E1 y E2), considerando el E2 como el electrodo de trabajo (potencial 200 mV, sensibilidad 10 nA).
- *Software* cromatográfico *Clarity Chromatography Station* para Windows, que representa cada monoamina según su t_R y transforma la señal eléctrica, para el posterior análisis de las áreas de los picos obtenidos.



Esquema 5. Equipo de HPLC (Agilent, serie 1100) utilizado en los ensayos de la presente Tesis Doctoral.

2.5.7.2. Metodología.

a) Fase móvil.

La fase móvil para la detección de monoaminas está formada por:

- Ácido fosfórico 85% (10 mM) 0,68 ml/l
 - EDTA- Na_2 (0,1 mM) 37,2 mg/l
 - Octanosulfonato sódico (0,4 mM) 86,5 mg/l
 - Acetonitrilo 3% 30 ml/l
- pH = 3,1

Filtrar la fase móvil a través de filtros de poliamida de 0,45 μm .

b) Preparación de las soluciones estándar.

Las soluciones madre de los compuestos cuantificados se preparan en solución de ácido perclórico (PCA) a una concentración 10 mM, y se conservan a -80°C . Esta solución de PCA consta de:

- PCA (0,3 N) 8,15 ml/250 ml
- Bisulfito sódico (0,4 mM) 10,4 mg/250 ml
- EDTA- Na_2 (0,4 mM) 37,5 mg/250 ml

Todas las soluciones madre de cada monoamina y sus metabolitos fueron preparadas a una concentración de 25 $\mu\text{mol/ml}$ y se conservaron a -80°C . A partir de

ellas se realizan diluciones seriadas 1:2 en PCA, en los siguientes intervalos de concentraciones:

- 12,5 - 400 pmol/ml para NA.
- 6,25 - 100 pmol/ml para A, L-DOPA, DOPAC, DA, 5-HIAA y 5-HT.

c) Preparación de las muestras.

- Sonicar la muestra en frío en 100 μ l de PCA (pulsos de 2 s a una potencia de 70%).
- Centrifugar a 13.000 rpm durante 5 min a 4°C.
- Trasvasar el sobrenadante a un vial e inyectar 10 μ l de cada monoamina o metabolito (2 μ l en el caso de la NA) en el sistema del HPLC. Conservar el precipitado para la valoración de proteínas (apartado 2.5.5.).

Cada 10 muestras se inyecta una solución constituida por un estándar de cada monoamina y metabolito, para controlar el t_R y el área de las mismas. Los estándares de diferentes concentraciones se utilizan para construir rectas patrón para cada compuesto medido, relacionando la concentración conocida del estándar con el área obtenida en su análisis cromatográfico. Mediante las rectas patrón se puede conocer la concentración de cada compuesto presente en la muestra. Teniendo en cuenta el volumen total de homogeneización, se calcula la concentración de monoaminas contenidas en el tejido completo. Finalmente, esa concentración es corregida por el contenido de proteínas del tejido en mg.

2.5.8. Técnicas de biología molecular.

Para valorar la abundancia de ARNm en las muestras se ha utilizado la técnica de la PCR (reacción en cadena de la polimerasa) en tiempo real (qRT-PCR). Esta técnica consiste en ciclos de temperaturas que permiten la amplificación de un fragmento de un gen. En cada ciclo de amplificación se duplica el número de copias de ese fragmento, de forma que cuanto más ARNm tenga la muestra inicialmente, menos ciclos son necesarios para alcanzar una determinada cantidad de ADN. Esto permite conocer el número de veces que un gen se expresa en una muestra respecto a otra. Para poder realizar este proceso son necesarios varios pasos. En primer lugar, se realiza la extracción del ARN total de la muestra. Como este ARN no puede utilizarse de molde en la PCR, antes de la amplificación se necesita un paso previo de transcripción inversa o retrotranscripción a ADN complementario (ADNc). Este ADNc será amplificado en un sistema de PCR, lo que permite cuantificar los niveles de ARNm y comparar la expresión de un gen entre diferentes muestras.

2.5.8.1. Esterilización y limpieza del material.**a) Agua DEPC.**

Todo el proceso de extracción de ARN se realizó utilizando agua tratada previamente con DEPC, sustancia que inactiva las RNAsas. Para ello, se añaden 500 µl de DEPC a 1 litro de agua ultrapura, se deja reposar toda la noche y se autoclava para inactivar el DEPC. En la presente Memoria nos referiremos a ella como agua DEPC.

b) Autoclave.

Todo el material de disección, de vidrio y algunas soluciones (agua DEPC y tampón MOPS 10x) se esterizaron en el autoclave. La esterilización se llevó a cabo a 125°C y con una presión de 1,4 bar durante 30-40 min.

c) Limpieza del material.

Durante la extracción, el material de disección se lavó con etanol al 70% entre muestras diferentes.

2.5.8.2. Electroforesis en geles de agarosa.

Para separar fragmentos de ARN o ADN de diferente peso molecular se realizó una electroforesis, utilizando geles diferentes según la finalidad de la misma.

a) Para ARN: gel en condiciones desnaturalizantes (gel MOPS).

La presencia de MOPS y de formaldehído en el gel asegura que el ARN se mantiene desnaturalizado durante el proceso de la electroforesis para que sus fragmentos se separen correctamente en función de su tamaño, puesto que se evita la formación de estructuras secundarias que modificarían la movilidad electroforética.

Las soluciones y tampones utilizados son:

- Tampón MOPS 10x:

- MOPS 0,2 M
- Acetato sódico 50 mM
- EDTA 10 mM

Disolver con H₂O DEPC y ajustar a pH=7. Tras autoclavar, enfriar en hielo.

- Tampón MOPS 1x: diluir el tampón MOPS 10x en agua DEPC.

Estos tampones son soluciones fotosensibles, por lo que deben aislarse de la luz durante todo su manejo (incluida la electroforesis).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

El gel MOPS se prepara mezclando agarosa al 1% con 3,7 ml de tampón MOPS 10x en un matraz, ajustando a un volumen final de 40 ml con agua DEPC. La mezcla se calienta en el microondas hasta que alcance la ebullición. Cuando se atempera, se añaden 2,13 ml de formaldehído, se agita y se prepara el gel en el molde con el peine. Antes de cargar las muestras, éstas se preparan de la siguiente forma:

- Añadir 1 µl de muestra a una mezcla que contiene:
 - Agua DEPC 4 µl/muestra
 - Bromuro de etidio (0,33 mg/ml) 1 µl/muestra
 - Formaldehído 3 µl/muestra
 - MOPS 10x 1,2 µl/muestra
 - Tampón de carga (6x) 2 µl/muestra
- Calentar durante 10 min a 65°C, enfriar rápidamente en hielo y cargar en el gel.

Las condiciones para la electroforesis son:

- Voltaje: 90 V.
- Tiempo: 30 min para geles de 10 cm y 40 min para geles de 15 cm.
- Tampón de electroforesis: MOPS 1x.

Con un transiluminador ultravioleta (UV) se comprueba la integridad del ARN (apartado 2.5.8.5.a).

b) Para ADN.

Los productos resultantes de la PCR se corren en un gel que contiene agarosa al 1,5% (p/v), disuelta en tampón Tris acetato-EDTA (TAE) a una concentración 1x (por dilución de TAE 10x en agua DEPC) hasta un tamaño final de 50 ó 100 ml, según el tamaño final del gel. En los casos en que es necesaria la purificación posterior del ADN contenido en cada banda, el gel se prepara utilizando una agarosa de bajo punto de fusión. La mezcla se funde en el microondas hasta que alcance la ebullición y, una vez atemperada, antes de solidificar, se añade 1 µl de bromuro de etidio (0,33 mg/ml), se agita y se prepara el gel en el molde con el peine. La electroforesis se lleva a cabo con tampón TAE 1x. A 8 µl de muestra se le añade una mezcla que contiene:

- Bromuro de etidio 1 µl/muestra
- Tampón de carga (6x) 1 µl/muestra

Las mezclas se cargan en el gel, añadiendo 2 µl del patrón de pesos moleculares conocidos (Novogen) a uno de los pocillos. Con un transiluminador UV se comprueba que las bandas obtenidas presentan el tamaño esperado.

2.5.8.3. Extracción del ARN.

El método de extracción del ARN total utilizado en los estudios incluidos en esta Memoria es una modificación de la técnica descrita en 1987 por Chomczynski y Sacchi, basada en la utilización de una sal de guanidina para romper las células, solubilizar sus componentes y desnaturalizar las ARNasas endógenas, y de una solución de fenol:cloroformo acidificada para la extracción propiamente dicha. En este caso se utilizó el reactivo comercial Trizol (TRI[®] Reagent, Sigma), que es una solución monofásica de tiocianato de guanidina y fenol en la que se solubiliza el tejido, y tras la adición de cloroformo, la mezcla se separa en tres fases: una fase acuosa conteniendo el ARN, una interfase con el ADN y una fase orgánica donde quedan las proteínas.

Las muestras se mantienen en un baño de hielo durante todo el proceso para minimizar el posible efecto de las ARNasas, excepto que se especifique otra temperatura. Todas las muestras del mismo tejido de cada diseño experimental se procesaron a la vez, siguiendo el protocolo indicado por la casa comercial:

- Homogeneizar los tejidos en Trizol (0,5 ml para tejidos centrales, 1 ml para tejidos periféricos). La homogeneización fue mecánica y se realizó de 3 maneras diferentes, según el experimento: aspirando con jeringuillas de 1 ml y agujas de 0,5 mm, homogeneizando con el Ultra-Turrax[®] o con bolas de circonio en un homogeneizador (Bertin Technologies).
- Incubar el homogeneizado durante 5 min a temperatura ambiente.
- Añadir 0,2 ml de cloroformo por cada ml de Trizol.
- Agitar vigorosamente con la mano durante 15 s.
- Incubar durante 2-15 min a temperatura ambiente.
- Centrifugar a 12.000 g durante 15 min a 4°C.
- Transferir la fase acuosa (que contiene el ARN) a un tubo nuevo.
- Añadir a la fase acuosa 500 µl de isopropanol frío (-20°C) por cada ml de Trizol y mezclar para precipitar el ARN.
- Incubar en baño de hielo durante 5-10 min.
- Centrifugar a 12.000 g durante 15 min a 4°C.
- Eliminar el sobrenadante.
- Añadir 1 ml etanol al 75% frío (-20°C).
- Resuspender el precipitado con vórtex.
- Centrifugar a 7.500 g durante 10 min a 4°C.
- Eliminar el etanol de lavado y secar el precipitado brevemente al aire.
- Resuspender en agua DEPC (20 µl para todas las muestras, excepto el riñón y el tejido interrenal, que se resuspendieron en 50 µl).
- Conservar a -80°C.

2.5.8.4. Tratamiento con ADNasa.

Los 20 µl de ARN de cada muestra se tratan con ADNasa, para eliminar posibles restos de ADN genómico. Se realizaron 2 protocolos diferentes:

1. Añadir a cada muestra la siguiente mezcla:

Tampón ADNasa 10x	2,5 µl/muestra
RQ1 ADNasa (Promega M6101)	1 µl/muestra
Inhibidor de ARNasa (<i>RNAsin</i> , Promega)	0,125 µl/muestra
DTT (100 mM)	0,5 µl/muestra
Agua DEPC	0,875 µl/muestra

- Incubar durante 40 min a 37°C.
- Parar la reacción con 2,5 µl de solución de parada.
- Precipitar el ARN con 1 ml etanol absoluto.
- Centrifugar a 12.000 g durante 10 min a 4°C.
- Lavar con 500 µl etanol 75%.
- Centrifugar a 12.000 g durante 5 min a 4°C.
- Eliminar el etanol.
- Resuspender en el volumen inicial de agua DEPC (20 µl).
- Conservar a -80°C.

2. Kit de ADNasa (Ambion), según el protocolo de la casa comercial:

- Añadir 2 µl de tampón y 2 µl de ADNasa a cada muestra.
- Incubar durante 30 min a 37°C.
- Añadir 2 µl del reactivo de inactivación de la ADNasa.
- Agitar en vórtex e incubar 2 min a 25°C.
- Centrifugar a 10.000 g durante 1 min.
- Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo.
- Conservar a -80°C.

2.5.8.5. Análisis del ARN.

a) Análisis de la integridad del ARN.

La integridad del ARN se analizó mediante uno de los siguientes métodos:

1. Gel MOPS.

Las muestras de ARN se analizaron en un gel MOPS. Si la integridad del ARN es buena, al observar el gel en un transiluminador UV se aprecian dos bandas nítidas correspondientes a las subunidades ribosómicas 18S y 28S. Si está degradado, se observa una mancha difusa (*smear*) a lo largo de todo el canal de carrera de la muestra.

2. Bioanalyzer.

La integridad del ARN se analizó por medio de una electroforesis, y se cuantificó mediante un número denominado RIN (*RNA integrity number*). El protocolo realizado es el siguiente:

- Preparar el gel según instrucciones del fabricante.
- Añadir 5 μ l del marcador.
- Calentar las muestras y el patrón de pesos moleculares a 70°C durante 2 min para desnaturalizar el ARN.
- Cargar el gel con 1 μ l de cada uno de ellos.
- Agitar durante 1 min.
- Analizar.

Se considera que la integridad del ARN es la correcta si tras la electroforesis se observan dos picos correspondientes a las subunidades ribosómicas 18S y 28S. Asimismo un número RIN de 10 indica una muestra de ARN pura.

b) Análisis de la pureza y cuantificación del ARN.

La espectrofotometría en la región del UV-visible es una de las técnicas más utilizadas en el análisis cualitativo y cuantitativo de los ácidos nucleicos. Se sabe que una unidad de absorbancia a 260 nm (A_{260}) equivale a 40 μ g/ml de ARN, de tal forma que al multiplicar la absorbancia de la muestra por 40, se obtendrá la concentración (en μ g/ml) de ARN. Otra medida que se utiliza es la absorbancia a 280 nm (A_{280}), que es la longitud de onda a la que las proteínas presentan su máximo de absorción (fundamentalmente debido a las cadenas laterales de los aminoácidos aromáticos). La ratio A_{260}/A_{280} indica la pureza del ARN. Debido a que los ácidos nucleicos también absorben a 280 nm, aunque aproximadamente sólo la mitad que a 260 nm, si la relación se encuentra en el intervalo entre 1,8 y 2 puede considerarse que la solución de ARN es pura, mientras que si tiene un valor menor (debido a un aumento de la absorbancia a 280 nm) indicaría la presencia de contaminación con proteínas o con algún compuesto con restos aromáticos, como el fenol.

El procedimiento para la cuantificación del ARN consiste en:

- Diluir 1:50 la muestra de ARN (1 μ l de muestra + 49 μ l de agua DEPC).
- Medir la absorbancia de los 50 μ l de ARN diluido a 260 y 280 nm.
- Calcular la concentración de ARN y la ratio A_{260}/A_{280} para cada muestra, teniendo en cuenta el factor de dilución.

En el caso de que la ratio A_{260}/A_{280} sea menor a 1,8, se procede a purificar el ARN siguiendo uno de los siguientes protocolos:

1. Precipitar las sales y repetir el lavado:

- Añadir 0,1 volúmenes de acetato sódico 3 M (pH 5,2) y 2,5 volúmenes de etanol absoluto frío (-20°C).
- Incubar durante 60 min a -80°C.
- Centrifugar a 12.000 g durante 15 min a 4°C.
- Eliminar el sobrenadante.
- Resuspender el precipitado en el volumen inicial con agua DEPC.

2. Dializar las muestras para eliminar las sales contaminantes. Todo el volumen de muestra se colocó sobre un filtro de tamaño de poro 0,025 µm (Millipore) situado sobre agua DEPC. Tras 30 min, se recuperó el volumen total de muestra, para cuantificar el ARN y valorar de nuevo su pureza mediante la ratio A_{260}/A_{280} .

Tras el tratamiento de las muestras con uno de los dos protocolos anteriores se observó un aumento notable de su pureza.

2.5.8.6. Retrotranscripción (RT) del ARN a ADNc.

La primera etapa del proceso consiste en la síntesis de una cadena de ADNc mediante la acción enzimática de la transcriptasa inversa sobre el ARN. La eficacia de este proceso depende de la cantidad y de la calidad del ARN de partida, por lo que es importante que el ARN no esté degradado ni contenga impurezas.

Para realizar la síntesis del ADNc se utilizan como cebadores una mezcla de oligodesoxirribonucleótidos (en su mayoría hexámeros) contruidos al azar (cebadores aleatorios o *random primers*), entre los que se incluyen los llamados oligo-dT, que se unen específicamente a la cola de poliA del ARNm. Estos cebadores dirigen la retrotranscripción indiscriminada de una mezcla de ARNs. Además, para la reacción son necesarios la enzima, un tampón para proporcionar el pH adecuado, cofactores de la reacción (como el $MgCl_2$), agentes que mantienen las cadenas separadas (como el DTT), un inhibidor de las ARNasas y una mezcla de los cuatro desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs) que constituirán el ADNc.

Se realizó la RT de 0,25-0,5 µg de ARN (según el tejido y el experimento), mediante uno de los siguientes protocolos:

1. - Añadir el volumen de muestra que contiene una determinada cantidad de ARN y completar con agua DEPC hasta un volumen final de 14,3 µl.
 - Añadir 1 µl de cebadores aleatorios (3 µg/µl).
 - Desnaturalizar a 65°C durante 5 min y poner en hielo.
 - Añadir 9,2 µl de una mezcla que contiene:

- dNTP (10 mM) 1,2 µl/muestra
 - Tampón 5x 5 µl/muestra
 - DTT (100 mM) 2,5 µl/muestra
 - Inhibidor de ARNasa (*RNAasin*, Promega) 0,5 µl/muestra
 - Incubar durante 2 min a 25°C para permitir la unión de los cebadores aleatorios.
 - Añadir 1,5 µl de una mezcla con:
 - Agua DEPC 1 µl/muestra
 - Retrotranscriptasa (*SuperScript*, Invitrogen) 0,5 µl/muestra
 - Incubar durante 10 min a 25°C.
 - Incubar durante 50 min a 42°C para que se produzca la retrotranscripción.
 - Inactivar la enzima durante 15 min a 70°C y enfriar.
 - Conservar a -20°C.
2. - Añadir el volumen de muestra que contiene una determinada cantidad de ARN y completar con agua DEPC hasta un volumen final de 18,9 µl.
- Añadir 31,1 µl de una mezcla que contiene:
 - dNTP (10 mM) 10 µl/muestra
 - Tampón TaqMan RT 10x 5 µl/muestra
 - MgCl₂ (25 mM) 11 µl/muestra
 - Oligo-dT (50 µM) 2,5 µl/muestra
 - Inhibidor ARNasa (Invitrogen) 1 µl/muestra
 - Retrotranscriptasa (*MultiScribe*, Invitrogen) 1,6 µl/muestra
 - Incubar durante 10 min a 25°C para permitir la unión de los oligo-dT.
 - Incubar durante 60 min a 48°C para que se produzca la retrotranscripción.
 - Inactivar la enzima durante 5 min a 95°C y enfriar.
 - Conservar a -20°C.

La síntesis del ADNc se realizó simultáneamente en todas las muestras del mismo tejido.

2.5.8.7. Diseño de cebadores.

Los cebadores son dos regiones cortas de ADN que flanquean el fragmento de ADN que se quiere amplificar. Para el diseño de los cebadores se tuvieron en cuenta varias consideraciones generales: la longitud del cebador (entre 18-21 nucleótidos), el contenido de guanina (G) y citosina (C) (aproximadamente el 50%), similar temperatura de fusión de los cebadores (no más de 5°C de diferencia) y baja probabilidad de formar dímeros y horquillas. Para ello se utilizaron dos *softwares*

gratuitos de diseño de cebadores: *Primer3* (Rozen y Skaletsky, 2000) y *Primer Express* (Applied Biosystems). El cebador que inicia la polimerización en sentido 5'→3' le denominaremos *forward*, y el que lo hace en dirección 3'→5' le denominaremos *reverse*.

Con el fin de comprobar que los cebadores diseñados amplifican la secuencia buscada, se realiza una PCR convencional (apartado 2.5.8.9.b) y se visualiza si el tamaño de las bandas es el esperado tras correr el producto en una electroforesis en gel de agarosa.

2.5.8.8. Secuenciación parcial del gen del receptor de melanocortinas tipo 2 (*mc2r*).

Se realizó una búsqueda en la base de datos *GenBank*, para conocer las secuencias disponibles en especies relacionadas: la carpa (*Cyprinus carpio*, AJ605725) y el pez cebra (*Danio rerio*, NM_180971). Estas secuencias se alinearon siguiendo el algoritmo ClustalW, disponible a través de la página web del *European Bioinformatics Institute* (EMBL-EBI, <http://www.ebi.ac.uk/tools/clustalw/>). Una vez alineadas las secuencias, se eligieron las zonas más conservadas para diseñar los cebadores degenerados (Tabla 1), para lo que se utiliza un código universal que expresa los nucleótidos de elección múltiple que se pueden encontrar en una posición determinada, siguiendo la correspondencia:

R = A/G	K = G/T	B = C/G/T	V = A/C/G
Y = C/T	S = C/G	D = A/G/T	N = A/C/G/T
M = A/C	W = A/T	H = A/C/T	

Tabla 1. Secuencia de los cebadores degenerados utilizados para la secuenciación del gen *mc2r* en el carpín y tamaño del amplicón producido.

Gen		Secuencia (5'→3')	Tamaño amplicón (pb)
<i>mc2r</i>	<i>Forward</i>	5'-ATCTTCAGCATCCTC(R)CCATAGC-3'	460
	<i>Reverse</i>	5'-GCGTGACTCACCAGTA(R)CACTACATGCAGCTG-3'	

Los nucleótidos de elección múltiple de los cebadores degenerados se indican entre paréntesis.

Estos cebadores amplificaron un segmento del ADNc del carpín en una PCR convencional, para lo que se utilizó el kit One-Step RT-PCR (Qiagen). El producto de

esta PCR se corrió en un gel de agarosa de bajo punto de fusión al 2% (p/v). La banda con el tamaño esperado se cortó y se purificó con el kit QIAquick PCR (Qiagen). El producto purificado se preparó para la secuenciación, amplificándolo con el siguiente protocolo:

- Mezclar el volumen correspondiente de producto purificado con el tampón de secuenciación, la enzima *BigDye 3.1* (Applied Biosystems) y uno de los cebadores utilizados (Tabla 1), según especificaciones de la casa comercial.
- Añadir agua estéril hasta completar 10 µl.
- Realizar una PCR convencional siguiendo el siguiente protocolo:
 - Incubar durante 1 min a 96°C.
 - Incubar durante 10 s a 96°C, 5 s a 50°C y 4 min a 60°C. Realizar 25 ciclos y enfriar.

El producto purificado y amplificado se secuenció en el sistema ABI PRISM 377 DNA, en las instalaciones de la Universidad de Bergen (Noruega). Este sistema permite analizar fragmentos de ADN marcados con fluoróforos, separándolos mediante electroforesis en gel de poliacrilamida. Estos fragmentos marcados con 4 fluoróforos diferentes (uno por cada tipo de nucleótido) se combinan y se cargan en una columna que contiene el gel, donde se separarán electroforéticamente en función de su tamaño. En la base del gel, los fluoróforos con los que han sido marcados los fragmentos son excitados por un láser, emitiendo luz de una longitud determinada según el fluoróforo. Las señales emitidas son almacenadas para su posterior análisis en el *software* gratuito *DNA Baser*. Se comprobó la identidad de la secuencia resultante mediante un BLAST en la web del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Para construir el filograma, las secuencias de nucleótidos de distintas especies de peces y mamíferos se tradujeron a aminoácidos, se alinearon con el algoritmo ClustalW y se introdujeron en el *software Translate* (<http://web.expasy.org/translate/>). Las especies cuyas secuencias fueron utilizadas para construir el filograma son: *C. carpio*, *D. rerio*, *O. mykiss* (NM_001124680), *Takifugu rubripes* (NM_001032764), *Tetraodon nigroviridis* (AY332239), *Mus musculus* (NM_008560), *Rattus norvegicus* (NM_001100491) y *Homo sapiens* (NM_000529).

2.5.8.9. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

a) Principios generales de la técnica.

La PCR es un proceso *in vitro* que consiste en la amplificación selectiva de una región de ADN. Este proceso requiere el conocimiento previo de la secuencia de al

menos dos regiones cortas que flanqueen el fragmento que se pretende amplificar, y que son utilizadas como cebadores en la reacción de elongación, catalizada por la ADN polimerasa. Para que la polimerasa reconozca a los cebadores y comience la elongación, es necesario que estos hibriden con las secuencias complementarias en el ADN molde, para lo que debe estar desnaturalizado. Así, la PCR consiste en la repetición de un ciclo integrado por tres etapas: fase de desnaturalización (a 94-95°C), fase de hibridación (cuya temperatura depende de los cebadores) y fase de elongación (depende de la enzima, normalmente a 72°C).

Para asegurar la ausencia de contaminación, se realizaron controles negativos sustituyendo el ADNc por ARN (para descartar la presencia de ADN genómico) y por agua estéril.

b) PCR convencional.

La amplificación del ADNc se realizó mediante uno de los siguientes protocolos:

1. - Añadir 1 µl de muestra a 24 µl de una mezcla constituida por:

- Cebador *forward* (10 µM) 1 µl/muestra
- Cebador *reverse* (10 µM) 1 µl/muestra
- Tampón 10x 2,5 µl/muestra
- dNTP (2 mM) 2,5 µl/muestra
- ADN polimerasa (Taq, Invitrogen) 0,25 µl/muestra
- MgCl₂ (50 mM) 0,75 µl/muestra
- Agua estéril 16 µl/muestra

- Activar la enzima incubando durante 3 min a 95°C. Seguidamente, aplicar 40 ciclos: 30 s a 95°C, 30 s a 60°C y 30 s a 72°C en cada ciclo. Al final, añadir un paso de elongación de 7 min a 72°C.

2. Kit One-Step PCR (Qiagen), según indicaciones de la casa comercial:

- Añadir 24,5 µl de la siguiente mezcla a 0,5 µl de ARN:

- Cebador *forward* (50 µM) 0,3 µl/muestra
- Cebador *reverse* (50 µM) 0,3 µl/muestra
- Tampón Q RT (5x) 5 µl/muestra
- dNTP (40 mM) 1 µl/muestra
- Mix de polimerasas 1 µl/muestra
- Inhibidor de ARNasa 0,25 µl/muestra
- Solución Q (5x) 5 µl/muestra
- Agua DEPC 11,65 µl/muestra

- Activar la enzima incubando 30 min a 50°C y 15 min a 95°C. Seguidamente, aplicar 35 ciclos: 40 s a 94°C, 60 s a 58°C y 60 s a 72°C en cada ciclo. Al final, añadir un paso de elongación de 10 min a 72°C.

c) PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR).

La PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR) permite medir la expresión génica gracias a la utilización de termocicladores especiales capaces de tomar datos durante el transcurso de la PCR, combinando la amplificación y la detección en un solo paso (Wong y Medrano, 2005).

Los termocicladores que realizan qRT-PCR incorporan un detector de fluorescencia. En nuestro caso, durante la reacción de amplificación se añadió un fluoróforo, el *SYBR Green*, denominado así porque presenta su máximo de emisión en la zona del espectro luminoso correspondiente a los verdes ($\lambda=522$ nm). Esta molécula emite fluorescencia al intercalarse en la doble hélice de ADN, de forma que a medida que aumenta el número de moléculas de ADN (por amplificación), aumenta la fluorescencia emitida (Bustin, 2000). Los valores de fluorescencia se miden al final de cada ciclo, de manera que cuanto más ADNc molde haya en una muestra, más fluorescencia emitirá y ésta se podrá detectar en un ciclo más temprano. El ciclo en el cual la fluorescencia emitida por una muestra es significativamente mayor que la fluorescencia basal se denomina ciclo umbral o *Ct* (*threshold cycle*). Este valor es el que se utiliza para comparar la expresión génica entre distintas muestras: cuanto menor sea el *Ct* de una muestra, mayor cantidad inicial de ARNm. Para una óptima cuantificación de los *Ct*, éstos deben estar en la fase exponencial de la amplificación (Gibson *et al.*, 1996). En las qRT-PCR realizadas en la presente Tesis Doctoral se estimaron como aceptables aquellas medidas que presentaban un *Ct* entre 10 y 30.

Para asegurar que las condiciones de la reacción de PCR son óptimas para realizar una cuantificación fiable, es necesario conocer la eficacia de amplificación para cada gen, que es la capacidad de la reacción para duplicar el número de copias de cadenas de ADNc en cada ciclo. La eficacia de una reacción debe ser del 100%, lo que equivaldría a una duplicación de la cantidad de ADNc por ciclo, si bien se aceptan valores entre el 90-105%. Para comprobarlo, se realizó una curva de diluciones seriadas de ARN y de ADNc (ver a continuación).

El método de cuantificación de la expresión génica utilizado es una cuantificación relativa denominada $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak y Schmittgen, 2001). Este método requiere que tanto el gen diana como el gen de referencia (que se caracteriza por no presentar variaciones en las condiciones experimentales utilizadas) sean amplificados con una eficacia similar y muy próxima al 100%. Los datos se relativizan respecto a un

grupo que se denomina control, que en nuestro caso es siempre el grupo experimental cuya media de expresión es la más baja. Para determinar la diferencia relativa en el nivel de expresión de los genes diana en las diferentes muestras, primero se normaliza el Ct del gen diana con el Ct del gen de referencia para cada muestra de modo individual obteniendo el valor conocido como ΔCt :

$$\Delta Ct = Ct_{\text{gen referencia}} - Ct_{\text{gen diana}}$$

A continuación se normaliza el ΔCt de cada muestra con el ΔCt del calibrador o control, obteniéndose el valor $\Delta\Delta Ct$:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{muestra}} - \Delta Ct_{\text{control}}$$

Finalmente, la expresión relativa del gen se calcula con la fórmula:

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = \text{expresión relativa}$$

De esta manera obtenemos cuántas veces se expresa el gen diana en cada muestra respecto al grupo control.

Previamente a la realización de la qRT-PCR, ésta se optimizó mediante la realización de 2 curvas estándar:

1. Curva de diluciones seriadas de ARN.

Para conocer la cantidad de ARN óptima para medir con fiabilidad la expresión génica, se realizó un banco de diluciones (1:3) conteniendo de 0,1 a 3 µg de ARN. Esta curva fue retrotranscrita y amplificada por qRT-PCR, lo que permite conocer la eficacia de ambas reacciones y la presencia o no de inhibidores. Se considera que la cantidad de ARN es óptima cuando su Ct está dentro del intervalo de fiabilidad (10-30 ciclos) y se encuentra en el intervalo en el que la eficacia de la curva es del 100%.

2. Curva de diluciones seriadas de ADNc.

Para saber si el ADNc se amplifica con una eficacia óptima se realizó un banco de diluciones (1:3) conteniendo de 0,1 a 3 µl de ADNc, que fue amplificado por qRT-PCR. Se considera que la reacción es óptima cuando la eficacia de la curva es del 100%. Esta curva se añadió en todas las placas al analizar la expresión de un gen por qRT-PCR.

Para valorar la expresión génica, se realizó una mezcla de reacción común para todas las muestras, que contenía:

- Cebador <i>forward</i> (10 µM)	0,7 µl/muestra
- Cebador <i>reverse</i> (10 µM)	0,7 µl/muestra
- SyBR Green	5 µl/muestra
- Agua estéril	2,6 µl/muestra

o bien:

- Cebador <i>forward</i> (50 μ M)	0,1 μ l/muestra
- Cebador <i>reverse</i> (50 μ M)	0,1 μ l/muestra
- SyBR Green	5 μ l/muestra
- Agua estéril	3,8 μ l/muestra

En cada pocillo se pipetearon 9 μ l de esta mezcla y se añadió 1 μ l de ADNc de forma que el volumen final de reacción fue de 10 μ l. La mezcla se incubó durante 3 min a 95°C, para activar la enzima, seguidos de 40 ciclos consistentes en 10 s a 95°C, 30 s a 58°C y 45 s a 72°C. La cuantificación de las muestras se realizó por duplicado.

En los estudios de expresión génica de esta Memoria, hemos utilizado la β -*actina* como gen de referencia.

2.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS.

El valor de las variables estudiadas se ha expresado mediante un parámetro de centralización (media aritmética) y otro de dispersión (error estándar de la media, e.e.m.). Si no se especifica otro método, el análisis estadístico de los resultados se realizó mediante el programa informático *Statgraphics*.

2.6.1. Análisis de regresión lineal.

El análisis de regresión indica si una variable dependiente, y , que se define por la función $y=ax+b$, depende de una variable independiente, x , lo que viene dado por el coeficiente de correlación, r^2 (Sokal y Rohlf, 1979). Cuanto más se acerque el valor de r^2 a 1, mayor es la relación lineal entre los valores de ambas variables.

2.6.2. Test t de Student.

Este test se aplica para analizar si las medias muestrales de dos únicos grupos experimentales proceden de una misma población (Sokal y Rohlf, 1979).

2.6.3. Análisis de la varianza (ANOVA) y test de comparaciones múltiples.

Cuando el número de medias muestrales a comparar fue mayor de dos, pero el criterio de clasificación de las mismas fue único, es decir, existe un único factor o fuente de variación, se utilizó el ANOVA de una vía. Para aplicar este test paramétrico las variables han de presentar una distribución normal y ser homocedásticas, es decir, debe existir homogeneidad de varianza entre ellas. En caso de no cumplirse ambas condiciones, los datos se transformaron logarítmicamente. Cuando el ANOVA resultó significativo se aplicó el test de comparaciones múltiples de Student-Newman-Keuls

(SNK) o el de mínima diferencia significativa (LSD, en las muestras del apartado 5 del capítulo II), que permiten determinar los pares de muestras que presentan diferencias significativas. Si tras la transformación de los datos siguen sin cumplirse las condiciones de normalidad y homocedasticidad, se aplicará el test no paramétrico de Kruskal-Wallis y, en caso de existir diferencias significativas entre grupos, éstas se determinarán con el test de comparaciones múltiples de Bonferroni.

En aquellos casos en que existen dos variables experimentales (factores) los datos se analizaron mediante un ANOVA de doble vía. En caso de interacción significativa entre ambos factores, los valores de cada grupo experimental se analizaron mediante una ANOVA de una vía.

2.6.4. Análisis de correlación de rango de Spearman.

Se utiliza el análisis de correlación de rango de Spearman en los casos en que se pretende conocer la correlación entre 2 variables, no por su valor real, sino por el orden que éste ocupa dentro de la distribución experimental. Por tanto, indica si la relación entre dos variables puede describirse por una función monotonica.

El valor estadístico del coeficiente de correlación de Spearman (ρ) puede alcanzar valores entre -1 y 1, siendo -1 una correlación negativa (los valores mayores de una variable se corresponden con los menores de otra variable), 0 la ausencia de correlación y 1 una correlación positiva entre las variables (los valores mayores de una variable se corresponden con los mayores de otra variable; Milton, 2007; Forthofer *et al.*, 2007).

Este test se ha aplicado a los datos de expresión de los genes *crf-r1* y *pomc* en el capítulo II, para conocer la correlación entre los diferentes grupos experimentales.

2.6.5. Periodogramas.

Para determinar el periodo de un determinado ritmo se construyó un periodograma de Sokolove-Bushell, utilizando el *software* de cronobiología *El Temps*®. La variable que determina la significación del periodo sigue una distribución de χ^2 . Esta variable se denomina Qp y representa la variabilidad existente entre las medias de los periodos presentes, de forma que cuanta mayor sea esta variabilidad, más significativo será el periodo. De esta forma, se detecta la repetibilidad de un patrón periódico presente en la serie, aunque éste no sea sinusoidal. El valor de Qp se puede transformar en porcentaje de varianza (%V) explicada por el periodo mediante su multiplicación por 100/n (siendo n = número de datos), lo que facilita la interpretación y permite la comparación de periodogramas obtenidos en diferentes circunstancias. Este periodograma debe ser aplicado a series de datos uniformemente muestreadas. Para

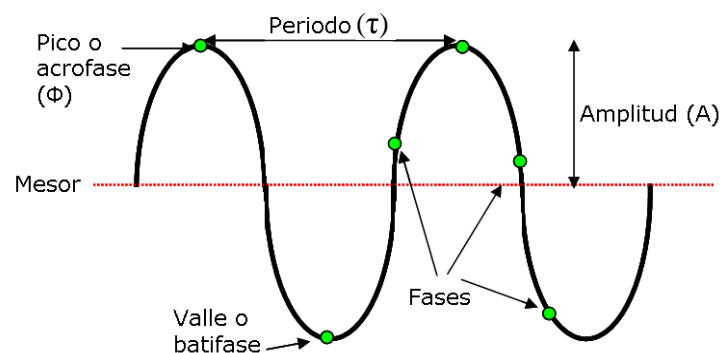
que el resultado sea fiable, es aconsejable utilizar series que contengan 10 o más ciclos completos del ritmo que se pretende detectar (Díez-Noguera, 2006).

2.6.6. Cosinor.

El cosinor es un método estadístico de análisis de ritmos que ajusta los valores a una función sinusoidal, teniendo en cuenta los siguientes parámetros que definen el ritmo (Esquema 6) (Díez-Noguera, 2006):

- Mesor (M): es el valor medio del ritmo. Se expresa en las unidades de la variable cuantificada.
- Fase: es un punto de referencia temporal del ritmo. Los más característicos serían el valor máximo, denominado pico o acrofase (Φ), y el valor mínimo, valle o batifase. La fase se expresa en unidades de tiempo circadiano (CT, en ausencia del sincronizador) o de tiempo *zeitgeber* (ZT, en presencia del sincronizador).
- Amplitud (A): si el ritmo se ajusta a un perfil sinusoidal, se llama amplitud a la distancia entre el mesor y la acrofase; si el perfil no es sinusoidal, es la distancia entre el máximo y el mínimo. Se expresa en las unidades de la variable cuantificada.
- Periodo (τ): representa el tiempo necesario para completar un ciclo, por lo que se expresa en unidades de tiempo.

Los ritmos diarios de expresión de genes reloj, de genes del eje HPI y de concentración de monoaminas encefálicas fueron determinados mediante un análisis cosinor con el ajuste por el método de mínimos cuadrados descrito por Duggleby (1981). La fórmula utilizada fue $f(t) = M + A \cdot \cos(t \cdot \pi/12 - \Phi)$, donde $f(t)$ es el valor de la variable a un tiempo dado, M es el mesor, A es la amplitud, t es el tiempo en horas y Φ es la acrofase en horas. El análisis utilizado para comprobar la significación del ritmo fue el test de amplitud cero, que indica si la amplitud sinusoidal es mayor que cero con una determinada probabilidad, que en nuestro trabajo hemos fijado en $p < 0,005$ (Koukkari y Sothorn, 2006).



Esquema 6. Representación de los parámetros característicos de un perfil sinusoidal.

2.6.7. Grados de significación.

Los grados de significación que consideramos en la presente Tesis Doctoral fueron los siguientes:

N.S. $p > 0,05$

*, #, §, ¤ $p < 0,05$

**, ##, §§ $p < 0,01$

***, ### $p < 0,001$

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CAPÍTULO I

**RITMICIDAD DIARIA EN EL EJE HIPOTÁLAMO-HIPÓFISIS-
INTERRENAL DEL CARPÍN: EXPRESIÓN DE GENES RELOJ Y
DE GENES FUNCIONALES DEL EJE**

RESUMEN I

El sistema circadiano de los peces se considera como una red de diferentes osciladores que funcionan independientemente, aunque se intercomunican entre sí. La maquinaria molecular de estos osciladores consta de bucles de retroalimentación positiva y negativa que regulan la transcripción y traducción de los denominados genes reloj, con *per* y *cry* formando parte del bucle negativo y *clock* y *bmal1* del positivo. Es conocido en los mamíferos que el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal constituye un elemento clave en el funcionamiento del sistema circadiano. Con el fin de investigar la posible ritmicidad circadiana del eje hipotálamo-hipófisis-interrenal (HPI) del carpín, nos planteamos examinar la expresión diaria de algunos genes funcionales relacionados con la actividad de dicho eje, así como la expresión de genes reloj.

Los carpines se aclimatan a un fotoperiodo de 12L:12D (encendido de las luces a las 7:30 h) y se alimentan diariamente a las 10:30 h durante 4 semanas, registrando de forma ininterrumpida la actividad locomotora. Tras este periodo de aclimatación, los peces se muestrean en intervalos de 3 h durante un ciclo completo de 24 h, extrayendo el hipotálamo, la hipófisis y el tejido interrenal para cuantificar la expresión de genes funcionales del eje HPI (*precursor de crf* en el hipotálamo, *crf-r1* y *pomc* en la hipófisis, y *mc2r* y *star* en el tejido interrenal) y de genes reloj (*per1a*, *per2a*, *per3*, *cry1a*, *cry2a*, *cry3*, *bmal1a*, *clock1a* y “*clock2-like*”, en los tres tejidos).

Los carpines muestran un ritmo de actividad con una periodicidad de 24,0 h, con valores significativamente mayores durante la fotofase y una marcada actividad anticipatoria al alimento, lo que demuestra la sincronización a los *zeitgebers* ciclo luz/oscuridad y horario fijo de alimentación. Entre los genes funcionales del eje HPI, únicamente *crf-r1* muestra un ritmo de expresión diaria significativa, lo que sugiere que la ritmicidad de estos receptores no parece estar directamente acoplada a la actividad del eje HPI, sino posiblemente a otras acciones hipofisiotrópicas del CRF. Por tanto, la posible ritmicidad circadiana del eje HPI no parece depender de la expresión rítmica de los genes analizados, si bien no podemos descartar una regulación a niveles post-transcripcionales.

En relación a los genes reloj, los tres tejidos analizados muestran de forma general un ritmo diario significativo en la expresión de todos ellos (excepto *per2a*, que solo se expresa rítmicamente en el hipotálamo, y *cry1a*, que no muestra oscilaciones en el tejido interrenal). Los perfiles temporales de expresión de cada gen son muy similares en todos los tejidos analizados. Las acrofases de los ritmos de *per1a*, *per3*, *cry1a* y *cry3* se sitúan en la interfase oscuridad/luz, en antifase con los ritmos de

bmal1a, *clock1a* y “*clock2-like*”, cuyas acrofases están en la interfase luz/oscuridad. Estos perfiles coinciden con los descritos en otras especies de peces, independientemente de su cronotipo, y en estudios similares en mamíferos. La acrofase de los ritmos de *per1a* y *cry3*, inmediatamente anterior al inicio del periodo de luz, sugiere una anticipación a la fotofase y/o la llegada de alimento, no siendo posible conocer la importancia relativa de cada uno de los dos *zeitgebers*, que coexisten en el diseño experimental. La acrofase de *per3* se produce inmediatamente antes de la administración del alimento, sugiriendo que el horario de alimentación podría ser el principal sincronizador que dirige los ritmos de expresión de este gen. La expresión de *cry1a*, con máximos al inicio de la fotofase, es rítmica en el hipotálamo y la hipófisis, pero no en tejidos periféricos, indicando que la luz puede resultar un sincronizador más potente que el horario de alimentación para este gen en tejidos centrales. Por otra parte, el ritmo de *per2a* en el hipotálamo muestra su acrofase en mitad del periodo de luz, apoyando que se trata de un gen inducible por la luz en osciladores fotosensibles. Respecto a los genes del bucle positivo, sus perfiles rítmicos de expresión, con acrofases cercanas a la interfase luz/oscuridad, están muy conservados en los teleósteos, pero muestran marcadas diferencias en relación a los datos de mamíferos y *Drosophila*, lo que puede sugerir diferentes mecanismos reguladores y/o funcionalidad de estos genes reloj a lo largo de la filogenia.

Por tanto, este es el primer estudio en peces que muestra una expresión rítmica de genes reloj a lo largo del eje HPI, y los resultados obtenidos sugieren que los elementos analizados (hipotálamo, hipófisis y tejido interrenal) potencialmente podrían actuar como osciladores funcionales, constituyendo posibles nodos de la red multioscillatoria del sistema circadiano de este teleósteo.

SUMMARY I

The circadian system of fish is considered as a network of different oscillators that work independently, although intercommunicate among them. The molecular machinery of these oscillators consists of negative and positive feedback loops that regulate the transcription and translation of the so-called clock genes, with *per* and *cry* as part of the negative loop and *clock* and *bmal1* as part of the positive loop. The hypothalamus-pituitary-adrenal axis of mammals is known to constitute a key element in the functioning of the circadian system. With the aim of investigating the possible circadian rhythmicity of the hypothalamus-pituitary-interrenal (HPI) axis in goldfish, we examine the daily expression of some functional genes related to the activity of the axis, and the expression of clock genes.

Goldfish are acclimated to a 12L:12D photoperiod (lights on at 7:30 h) and scheduled daily feeding at 10:30 h during 4 weeks, recording continuously the locomotor activity. After this acclimation period, fish are sampled at 3 h intervals during a whole 24-h cycle, and the hypothalamus, pituitary and interrenal tissue are removed to quantify the expression of HPI axis functional genes (*crf precursor* in the hypothalamus, *crf-r1* and *pomc* in the pituitary, and *mc2r* and *star* in the interrenal tissue) and clock genes (*per1a*, *per2a*, *per3*, *cry1a*, *cry2a*, *cry3*, *clock1a*, *bmal1a* and “*clock2-like*”, in the three tissues).

Goldfish show an activity rhythm with a periodicity of 24.0 h, with significantly higher values during the photophase and a marked food anticipatory activity. These results demonstrate synchronization to the *zeitgebers* light/dark cycle and scheduled feeding time. Among the HPI axis functional genes, only *crf-r1* shows a significant daily rhythm of expression, suggesting that the rhythmicity of these receptors is not directly coupled to the activity of the HPI axis, but to other hypophysiotrophic actions of the CRF. Thus, the possible circadian rhythmicity of the HPI axis does not seem to depend on the rhythmic expression of the analysed genes, although a regulation at post-transcriptional levels cannot be discarded.

Regarding to clock genes, the three tissues analysed show generally a daily significant rhythm of expression of all of them (except *per2a*, that is expressed rhythmically only in the hypothalamus, and *cry1a*, that does not show oscillations in the interrenal tissue). The temporal profiles of expression of each gene are very similar in all the tissues analysed. The acrophases of *per1a*, *per3*, *cry1a* and *cry3* are in the dark/light transition, in antiphase with *clock1a*, *bmal1a* and “*clock2-like*” rhythms, whose acrophases are in the light/dark transition. These profiles agree with the ones previously described in other fish species, independently of their chronotype, and in

similar studies in mammals. The acrophases of *per1a* and *cry3* rhythms are immediately prior to the onset of the light, suggesting anticipation to the photophase and/or to the food arrival, although it is not possible to discriminate the relative importance of each one of the two *zeitgebers*, which coexist in the experimental design. The acrophase of *per3* rhythm timed immediately before food administration, suggesting that feeding time could be the main synchronizer that drives the expression rhythms of this gene. The expression of *cry1a* shows a maximum at the beginning of the photophase, being rhythmic in the hypothalamus and the pituitary, but not in peripheral tissues. These results indicate that light can be a more potent synchronizer than feeding time for this gene in central tissues. On the other hand, the rhythm of *per2a* in the hypothalamus displays its acrophase in the middle of the light period, supporting that this gene is light-inducible in photosensitive oscillators. Regarding to the genes of the positive loop, their rhythmic expression profiles, with acrophases close to the light/dark transition, are highly conserved in teleosts, although show marked differences in relation to data from mammals and *Drosophila*, which can suggest different regulatory mechanisms and/or functions of these genes throughout phylogeny.

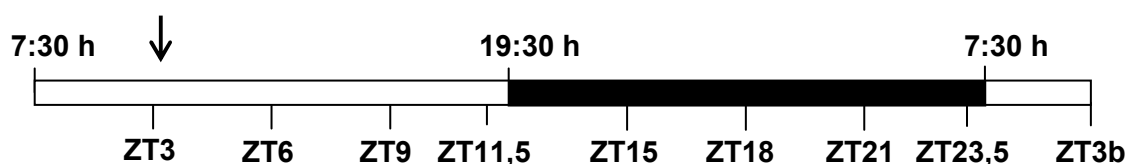
Thus, this is the first report in fish showing a rhythmic expression of clock genes throughout the HPI axis, and the obtained results suggest that the studied tissues (hypothalamus, pituitary and interrenal tissue) could potentially act as functional oscillators, constituting possible nodes within the multioscillatory network of the circadian system of this teleost.

I.1. **OBJETIVO.**

Con el fin de investigar la ritmicidad circadiana del eje HPI, nos planteamos examinar la expresión diaria de genes relacionados con la producción hormonal de dicho eje (llamados genes funcionales), así como la expresión de genes reloj tanto del bucle positivo como negativo, en los tejidos que componen el eje HPI (hipotálamo, hipófisis y tejido interrenal).

I.2. **DISEÑO EXPERIMENTAL.**

Los carpines ($11,23 \pm 0,29$ g) fueron aclimatados durante 4 semanas en condiciones de fotoperiodo 12L:12D (encendido de las luces a las 7:30 h) y alimentación diaria a las 10:30 h. Los peces se mantuvieron agrupados en acuarios de 60 l ($n=9$ /acuario), registrando de forma ininterrumpida la actividad locomotora. Finalizado el periodo de aclimatación, los peces se sacrificaron cada 3 horas a lo largo de un ciclo completo de 24 horas ($n=8$ /hora de muestreo). Para evitar las interfases luz/oscuridad y oscuridad/luz se comenzó a muestrear 30 min antes en aquellos puntos que coincidían con el cambio de fase. Los peces sacrificados en ZT3 y ZT3b recibieron la última ración de alimento 24 horas antes del muestreo. La correspondencia entre los valores de ZT, las horas de muestreo y el horario de alimentación se detalla en el Esquema 1.1:



Esquema 1.1. Horario de muestreo a lo largo de un ciclo de 24 horas en el estudio de la expresión diaria de genes reloj y de genes funcionales del eje HPI en el carpín. La flecha indica la hora de la administración diaria del alimento. Las barras horizontales blanca y negra representan las fases de luz y oscuridad, respectivamente.

Para realizar el muestreo los peces se anestesiaron en un baño de agua-hielo, procediendo rápidamente a la extracción del hipotálamo, la hipófisis y el tejido interrenal. Las muestras se conservaron a -80°C hasta su utilización para analizar la expresión génica mediante qRT-PCR (apartado 2.5.8. de la sección de Materiales y métodos). Se analizó la expresión de los siguientes genes funcionales del eje HPI:

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

- precursor de *crf* en el hipotálamo.
- receptor de CRF tipo 1 (*crf-r1*) y proopiomelanocortina (*pomc*) en la hipófisis.
- receptor de melanocortinas tipo 2 (*mc2r*) y proteína aguda reguladora de la esteroidogénesis (*star*) en el tejido interrenal.

Además, en los 3 tejidos extraídos se analizó la expresión de los genes reloj *per1a*, *per2a*, *per3*, *cry1a*, *cry2a* y *cry3*, elementos del bucle negativo del mecanismo molecular del reloj biológico, y *bmal1a*, *clock1a* y “*clock2-like*”, elementos del bucle positivo.

Los números de acceso de los genes analizados, las secuencias de los cebadores utilizados y el tamaño de los amplicones obtenidos se muestran en las Tablas 1.1 y 1.2:

Tabla 1.1. Números de acceso, secuencia de cebadores y tamaño de los amplicones de genes funcionales del eje HPI y del gen de referencia (*β-actina*) cuya expresión se analizó mediante qRT-PCR en el hipotálamo, la hipófisis y el tejido interrenal del carpin.

Gen		Secuencia (5'→3')	Tamaño amplicón (pb)	Número acceso (Genbank)
<i>precursor de crf</i>	Forward	5'-GGCTCTGCTCGTTGCCTTT-3'	121	AF098629
	Reverse	5'-CCCTAAGCGTGCCAAAACC-3'		
<i>crf-r1</i>	Forward	5'-TCTCTCTGGGAGCCCTGTTG-3'	121	AY688836
	Reverse	5'-AGGTGGCATTTCGCAGGAT-3'		
<i>pomc</i>	Forward	5'-CTCACCCTGACGAGAACATCTTG-3'	121	AJ431209
	Reverse	5'-CGGTTTGCTCCAGCTCAGA-3'		
<i>mc2r</i>	Forward	5'-TGCCAACAGGATCGCATCTA-3'	101	FJ554533
	Reverse	5'-CCACAAACACCCCAATCAAGA-3'		
<i>star</i>	Forward	5'-ATGAGTAAAGTTCTACCAGGCATTGG-3'	121	AY877430
	Reverse	5'-GGTTCCAATCCCCATTTGT-3'		
<i>β-actina</i>	Forward	5'-GGCCTCCCTGTCTATCTTCC-3'	156	AB039726
	Reverse	5'-TTGAGAGGTTTGGGTTGGTC-3'		

Tabla 1.2. Números de acceso, secuencia de cebadores y tamaño de los amplicones de genes reloj cuya expresión se analizó mediante qRT-PCR en el hipotálamo, la hipófisis y el tejido interrenal del carpín.

Gen		Secuencia (5'→3')	Tamaño amplicón (pb)	Número acceso (Genbank)
<i>per1a</i>	Forward	5'-AGCGCCACTTCCTCCTCTGA-3'	130	EF690698
	Reverse	5'-CCAACGGACAGCAGGTCTTCA-3'		
<i>per2a</i>	Forward	5'-TTTGTCAATCCCTGGAGCCGC-3'	116	EF690697
	Reverse	5'-CGTGGCTGAGGGCAAATCCTT-3'		
<i>per3</i>	Forward	5'-GGCTATGGCAGTCTGGCTAGTAA-3'	130	EF690699
	Reverse	5'-GACATTGCAGCGGTTTTGTGCTG-3'		
<i>cry1a</i>	Forward	5'-TACCGGCTGCCACCAACAAC-3'	106	EF690700
	Reverse	5'-TTTGGCCAAGTGGGCTGAGG-3'		
<i>cry2a</i>	Forward	5'-CGCTCTCCCTGTATGGTCAAC-3'	102	EF690701
	Reverse	5'-AAGGCAACCCGATCTGTGTGC-3'		
<i>cry3</i>	Forward	5'-GGTGAGACAGAAGCCCTGGAA-3'	102	EF690702
	Reverse	5'-CGCTCAATCACTGTTCGCAAGC-3'		
<i>bmal1a</i>	Forward	5'-ATCGATGAGTCGTTCCCGTG-3'	161	
	Reverse	5'-AGATTCTGTTCGTCTCGGAG-3'		
<i>clock1a</i>	Forward	5'-TCCTGGATCTGCCGCAGTTCAT-3'	189	
	Reverse	5'-CGATGGCAGCATCTCTTGTGT-3'		
"clock2-like"	Forward	5'-ATGACACTGAGCAATCAGCTCC-3'	172	
	Reverse	5'-CGTGGAGGATGTGTGTGATGAA-3'		

La secuenciación de los genes *bmal1a*, *clock1a* y "clock2-like" ha sido realizada recientemente por nuestro grupo de investigación (Velarde *et al.*, 2011), si bien las secuencias aún no han sido enviadas a la base de datos del NCBI, por lo que no poseen un número de acceso.

1.3. RESULTADOS.

Los carpines utilizados en el presente estudio muestran un patrón de actividad locomotora claramente diurno, con niveles de actividad motora general significativamente mayores durante el periodo de luz (7:30 h-19:30 h) que en la fase de oscuridad (19:30 h-7:30 h), como se observa en el actograma de la Figura 1.1a (que representa la actividad durante los últimos 14 días del periodo de aclimatación). La actividad locomotora registrada sigue una periodicidad diaria, obteniéndose a partir del periodograma un valor de periodo (tau, τ), de 24,0 h (Figura 1.1b). Además, puede

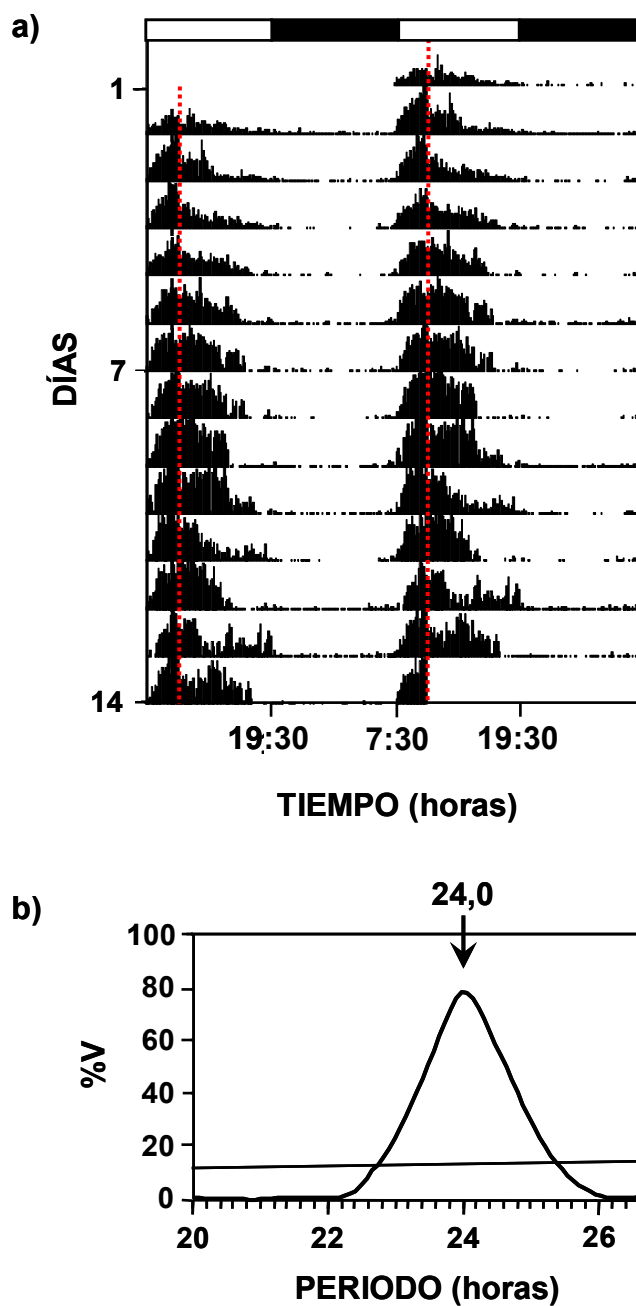


Figura 1.1. a) Actograma y **b)** periodograma de la actividad locomotora registrada en un acuario representativo. Las barras horizontales blancas y negras sobre el actograma representan la fase de luz (7:30-19:30 h) y de oscuridad (19:30-7:30 h), respectivamente, del fotociclo diario. La línea roja punteada indica la hora de administración del alimento (10:30 h). El valor de un periodo significativo se representa por un pico y se indica con una flecha ($p < 0,05$).

observarse que en las 2-3 horas previas a la hora habitual de administración del alimento se registra una marcada actividad anticipatoria al alimento (FAA).

Los niveles de expresión diaria de los genes analizados se muestran en gráficas que representan la expresión relativa de todos los genes estudiados en cada tejido en función del tiempo *zeitgeber* (ZT), siendo ZT0 la hora de encendido de las luces (7:30 h). Los parámetros de ajuste a una función sinusoidal de los valores de expresión génica cuantificados por qRT-PCR se presentan en tablas que incluyen la amplitud y la acrofase del ritmo diario para cada gen.

La Figura 1.2 muestra las variaciones diarias en la expresión de los genes funcionales del eje HPI a lo largo de un ciclo completo de 24 horas. Únicamente el *crf-r1* muestra un ritmo diario de expresión significativo de baja amplitud (0,57) y con su acrofase en mitad de la escotofase (ZT19), existiendo además diferencias significativas entre los diferentes puntos de muestreo ($p < 0,05$; Figura 1.2b). Encontramos variaciones diarias significativas ($p < 0,05$) en la expresión del *precursor de crf* en el hipotálamo, aunque el ritmo diario de expresión no resultó ser estadísticamente significativo (Figura 1.2a). Ninguno del resto de transcritos cuantificados, ni la *pomc* en la hipófisis (Figura 1.2b), ni el *mc2r* o *star* en el tejido interrenal (Figura 1.2c) exhiben un ritmo diario significativo (intervalo de confianza de la amplitud menor que cero) (Tabla 1.3).

Tabla 1.3. Parámetros que definen las funciones sinusoidales teóricas del análisis cosinor a las que se ajustan las variaciones diarias de la expresión de genes funcionales del eje HPI en el hipotálamo (*precursor de crf*), la hipófisis (*crf-r1* y *pomc*) y el tejido interrenal (*mc2r* y *star*) de *Carassius auratus*.

TEJIDO	GEN	Amplitud (ur)	Acrofase (h)
HIPOTÁLAMO	<i>precursor de crf</i>	$0,31 \pm 0,13$ [0,63/-0,04]	$3,44 \pm 1,74$ [7,35/23,53]
HIPÓFISIS	<i>crf-r1</i>	$0,57 \pm 0,17$ * [1,02/0,12]	$19,04 \pm 1,10$ [21,97/16,11]
	<i>pomc</i>	$3,69 \pm 1,47$ [7,6/-0,22]	$19,86 \pm 1,41$ [23,61/16,11]
TEJIDO INTERRENAL	<i>mc2r</i>	$0,44 \pm 0,43$ [1,58/-0,7]	$9,48 \pm 3,51$ [18,82/0,14]
	<i>star</i>	$0,38 \pm 0,32$ [1,23/-0,47]	$7,03 \pm 3,18$ [15,49/22,57]

Los datos se representan como estimación \pm error estándar de cada parámetro sinusoidal. La amplitud se expresa en unidades de expresión relativa (ur). La acrofase se expresa en tiempo *zeitgeber* (horas, h). El intervalo de confianza al 99% se indica entre corchetes. * Test de amplitud cero significativo ($p < 0,005$).

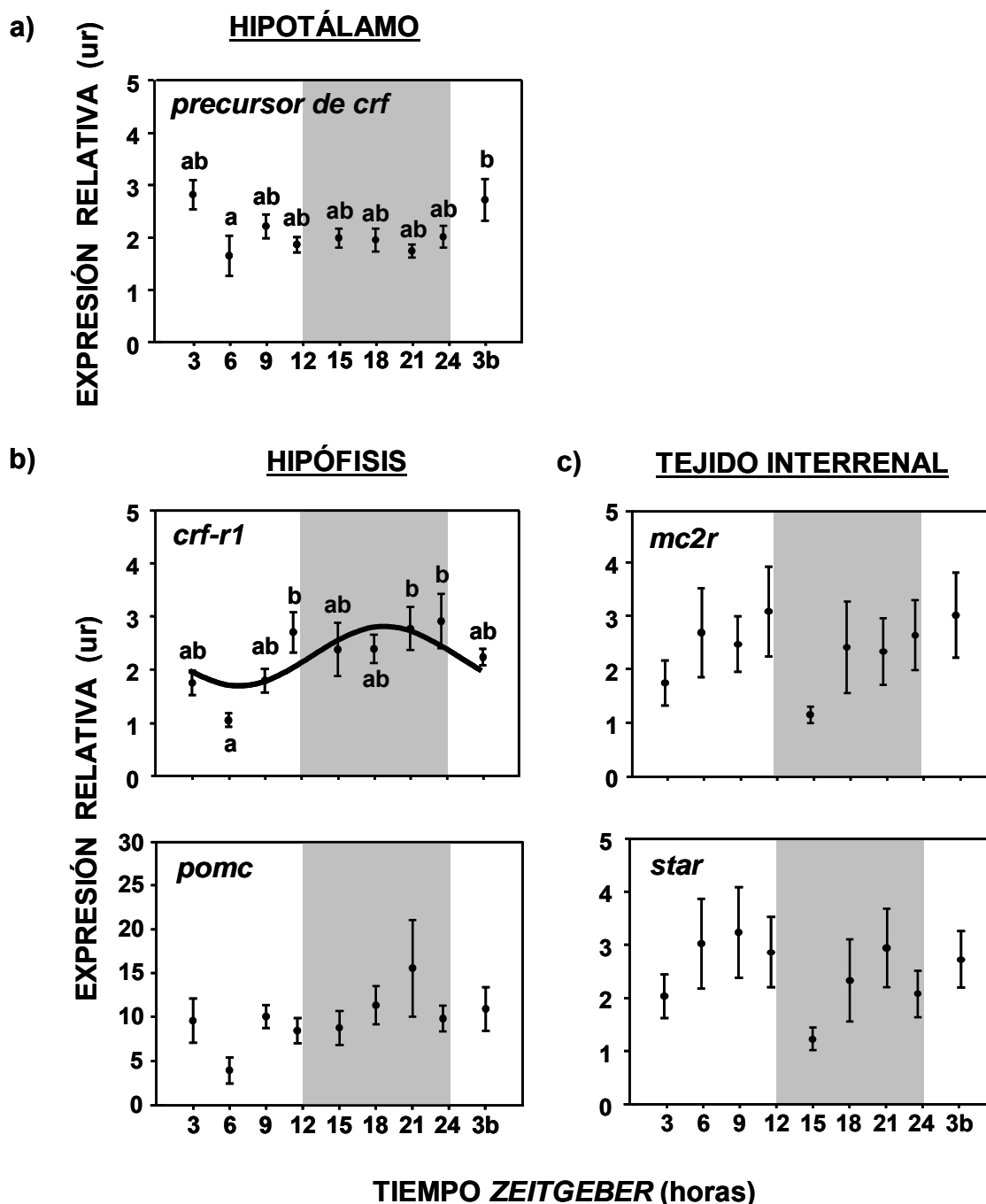


Figura 1.2. Expresión relativa de los genes del a) *precursor de crf* en el hipotálamo, b) *crf-r1* y *pomc* en la hipófisis y c) *mc2r* y *star* en el tejido interrenal de carpines mantenidos en condiciones de 12L:12D (encendido de las luces a las 7:30 h) y alimentación diaria a las 10:30 h. El área sombreada representa la fase oscura del fotociclo. Los datos se expresan como la media \pm e.e.m. ($n=8$ /hora de muestreo). Diferentes letras indican diferencias estadísticas ($p<0,05$). La línea negra gruesa muestra la función sinusoidal periódica ajustada a un ritmo cuando el análisis cosinor es significativo ($p<0,005$).

Todos los genes reloj analizados en el hipotálamo muestran un ritmo diario de expresión, con los límites de los intervalos de confianza de la amplitud mayores que cero en todos los casos (Figura 1.3, Tabla 1.4). Entre los genes del bucle negativo, el gen *per1a* presenta la mayor amplitud (20,93), seguido de *per3* y *cry3* (5,43 y 3,43, respectivamente), mientras que los genes con menor amplitud son *per2a*, *cry1a* y *cry2a* (menor a 1). Las acrofases de los ritmos diarios de *per1a*, *per3* y *cry3* aparecen en la interfase oscuridad/luz (ZT22-1,5), adelantadas unas horas respecto a las de los genes *per2a* y *cry1a* (ZT5 y ZT4, respectivamente) y en antifase con la del gen *cry2a* (ZT10,5). Los genes del bucle positivo, *bmal1a*, *clock1a* y “*clock2-like*”, presentan sus acrofases en las últimas horas del periodo de luz (ZT8-11,5). Las amplitudes de los ritmos de *bmal1a* y “*clock2-like*” (2,12 y 2,94, respectivamente) son entre 7 y 10 veces mayores que la amplitud que presenta el ritmo de expresión de *clock1a* (0,37).

Tabla 1.4. Parámetros que definen las funciones sinusoidales teóricas del análisis cosinor a las que se ajustan las variaciones diarias de la expresión de los genes reloj (*per1a*, *per2a*, *per3*, *cry1a*, *cry2a*, *cry3*, *bmal1a*, *clock1a* y “*clock2-like*”) en el hipotálamo, la hipófisis y el tejido interrenal de *Carassius auratus*.

GEN	HIPOTÁLAMO		HIPÓFISIS		TEJIDO INTERRENAL	
	Amplitud (ur)	Acrofase (h)	Amplitud (ur)	Acrofase (h)	Amplitud (ur)	Acrofase (h)
<i>per1a</i>	20,93 ± 2,04* [26,36/15,5]	22,73 ± 0,35 [23,66/21,79]	14,57 ± 2,06* [20,05/9,09]	23,18 ± 0,51 [24,54/21,82]	10,1 ± 1,53* [14,17/6,03]	23,44 ± 0,56 [24,93/21,95]
<i>per2a</i>	0,49 ± 0,07* [0,68/0,3]	5,4 ± 0,56 [6,89/3,91]	0,83 ± 0,34 [1,73/-0,07]	0,42 ± 1,6 [4,68/20,16]	0,16 ± 0,31 [0,98/-0,66]	2,69 ± 7,95 [23,84/5,54]
<i>per3</i>	5,43 ± 0,39* [6,47/4,39]	1,53 ± 0,3 [2,32/0,73]	14,99 ± 1,38* [18,66/11,32]	0,95 ± 0,37 [1,93/23,97]	5,11 ± 0,64* [6,81/3,41]	2,58 ± 0,51 [3,94/1,22]
<i>cry1a</i>	0,95 ± 0,11* [1,24/0,66]	3,94 ± 0,48 [5,21/2,66]	0,58 ± 0,17* [1,03/0,13]	3,32 ± 1,18 [6,46/0,18]	2,66 ± 1,83 [7,53/-2,21]	9,42 ± 2,47 [15,99/2,85]
<i>cry2a</i>	0,84 ± 0,12* [1,16/0,52]	10,55 ± 0,51 [11,91/9,19]	1,37 ± 0,21* [1,93/0,81]	12,23 ± 0,59 [13,8/10,66]	1,64 ± 0,52* [3,02/0,26]	13,1 ± 1,26 [16,45/9,75]
<i>cry3</i>	3,43 ± 0,33* [4,31/2,55]	22,15 ± 0,34 [23,05/21,25]	4,75 ± 0,63* [6,43/3,07]	21,86 ± 0,48 [23,14/20,58]	2,14 ± 0,6* [3,74/0,55]	19,17 ± 1,03 [21,91/16,43]
<i>bmal1a</i>	2,12 ± 0,16* [2,55/1,69]	9,45 ± 0,26 [10,14/8,76]	1,86 ± 0,26* [2,55/1,17]	10,26 ± 0,5 [11,59/8,93]	0,94 ± 0,3* [1,74/0,14]	13,1 ± 1,24 [16,4/9,8]
<i>clock1a</i>	0,37 ± 0,08* [0,58/0,16]	11,47 ± 0,78 [13,54/9,40]	1,16 ± 0,18* [1,64/0,68]	12,64 ± 0,59 [14,21/11,07]	2,63 ± 0,53* [4,04/1,22]	13,78 ± 0,78 [15,85/11,71]
“ <i>clock2-like</i> ”	2,94 ± 0,28* [3,68/2,2]	8,04 ± 0,34 [8,94/7,14]	1,28 ± 0,3* [2,08/0,48]	8,58 ± 0,8 [10,71/6,45]	1,12 ± 0,29* [1,89/0,35]	9,83 ± 0,91 [12,25/7,41]

Los datos se representan como estimación ± error estándar de cada parámetro sinusoidal. La amplitud se expresa en unidades de expresión relativa (ur). La acrofase se expresa en tiempo *zeitgeber* (horas, h). El intervalo de confianza al 99% se indica entre corchetes. * Test de amplitud cero significativo (p<0,005).

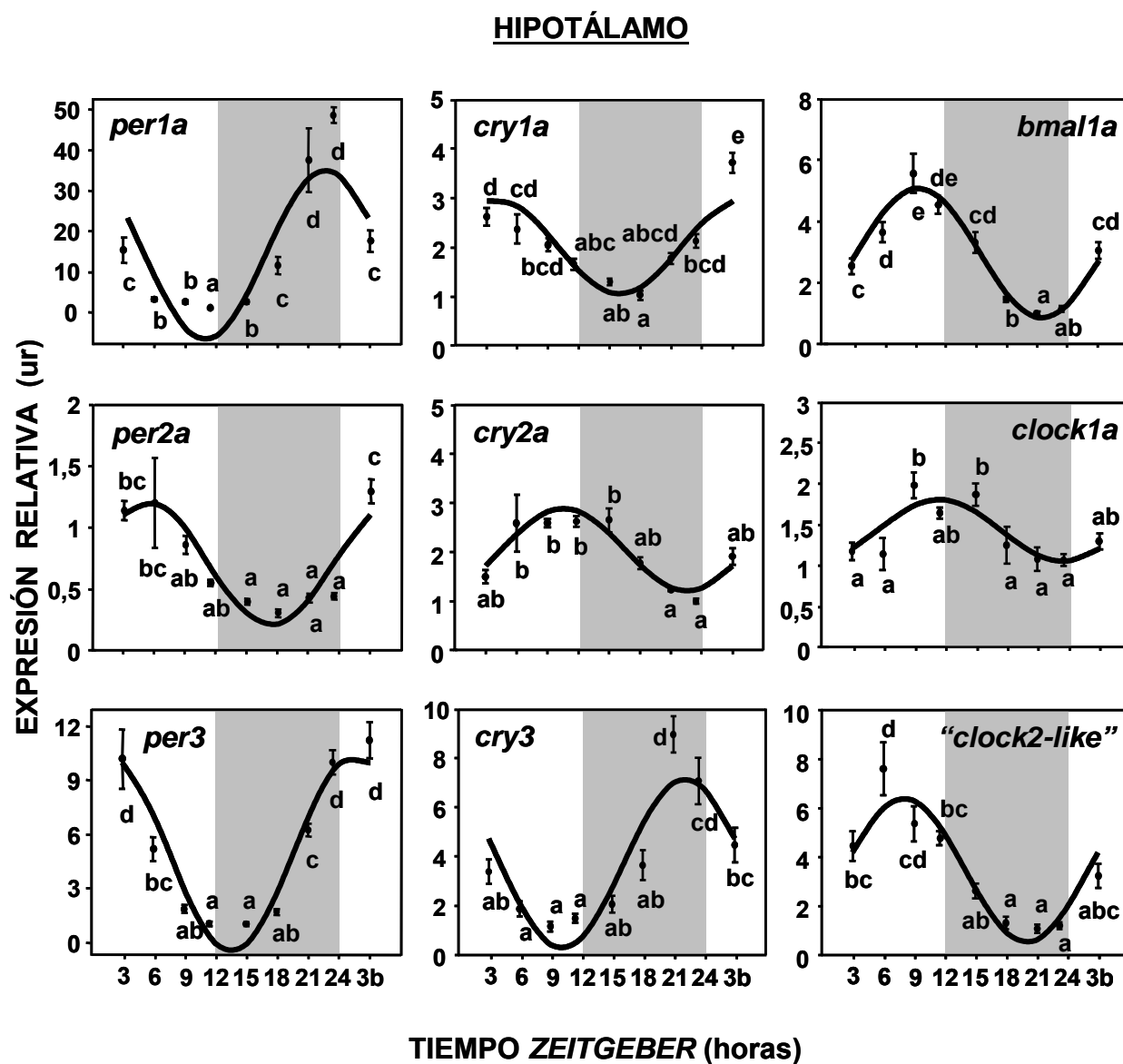


Figura 1.3. Expresión relativa de los genes reloj estudiados en el hipotálamo de carpines mantenidos en condiciones de 12L:12D (encendido de las luces a las 7:30 h) y alimentación diaria a las 10:30 h. El área sombreada representa la fase oscura del fotociclo. Los datos se expresan como la media \pm e.e.m. ($n=8$ /hora de muestreo). Diferentes letras indican diferencias estadísticas ($p<0,05$). Las líneas negras gruesas muestran la función sinusoidal periódica ajustada a un ritmo cuando el análisis cosinor es significativo ($p<0,005$).

La Figura 1.4 muestra el perfil diario de los genes reloj pertenecientes al bucle negativo y al bucle positivo en la hipófisis de *Carassius auratus*. Dichos genes reloj se expresan de forma rítmica en este tejido a excepción de *per2a*, que aunque muestra diferencias significativas entre los puntos de muestreo, no presenta un ritmo diario de expresión estadísticamente significativo. Los perfiles rítmicos de los genes analizados en la hipófisis son muy similares a los descritos previamente en el hipotálamo. Así, los genes *per1a*, *per3* y *cry3* alcanzan su máxima expresión en la interfase oscuridad/luz, (acrofases entre ZT22 y ZT1), en antifase con la del gen *cry2a* (ZT12) y la de los genes del bucle positivo (*bmal1a*, *clock1a* y “*clock2-like*”), que presentan acrofases al final de la fase luminosa y en la interfase luz/oscuridad (ZT8,5-12,5). Asimismo, y al igual que ocurre en el hipotálamo, el gen *cry1a* muestra un ritmo ligeramente retrasado respecto al mostrado por el resto de genes del bucle negativo analizados, con su acrofase en ZT3. Los genes *per1a* y *per3* son los que presentan los ritmos de mayor amplitud (14,57 y 14,99, respectivamente), seguidos de *cry3* (4,75), mientras que la expresión rítmica del resto de genes analizados es de baja amplitud, con valores menores de 2 en todos los casos (Tabla 1.4).

Finalmente, en el tejido interrenal los genes *per1a*, *per3*, *cry2a*, *cry3*, *bmal1a*, *clock1a* y “*clock2-like*” también muestran un ritmo diario significativo de expresión (Figura 1.5, Tabla 1.4), con perfiles similares a los encontrados en el hipotálamo y la hipófisis. Los transcritos de *per2a* y *cry1a* no siguen un ritmo estadísticamente significativo (límites del intervalo de confianza de la amplitud mayores que cero), ni muestran diferencias significativas entre los valores máximos y los mínimos hallados en las diferentes horas de muestreo. Los genes *per1a* y *per3* son los que presentan una mayor amplitud (10,1 y 5,11, respectivamente), con acrofases en la interfase oscuridad/luz para *per1a* (ZT23) y ligeramente retrasada en el caso de *per3* (ZT2,5). El ritmo del gen *cry2a* muestra una acrofase en la interfase luz/oscuridad (ZT13), de forma similar a lo descrito para este gen en el hipotálamo y la hipófisis. Respecto a los parámetros que definen los ritmos diarios de los genes del bucle positivo, la amplitud del gen *clock1a* (2,63) es aproximadamente el doble y el triple que la de los genes “*clock2-like*” y *bmal1a*, respectivamente. Sus valores de máxima expresión aparecen en la interfase luz/oscuridad, en las últimas horas de la fotofase para “*clock2-like*” (ZT10) y en las primeras horas de la escotofase para *bmal1a* y *clock1a* (ZT13 y ZT14, respectivamente).

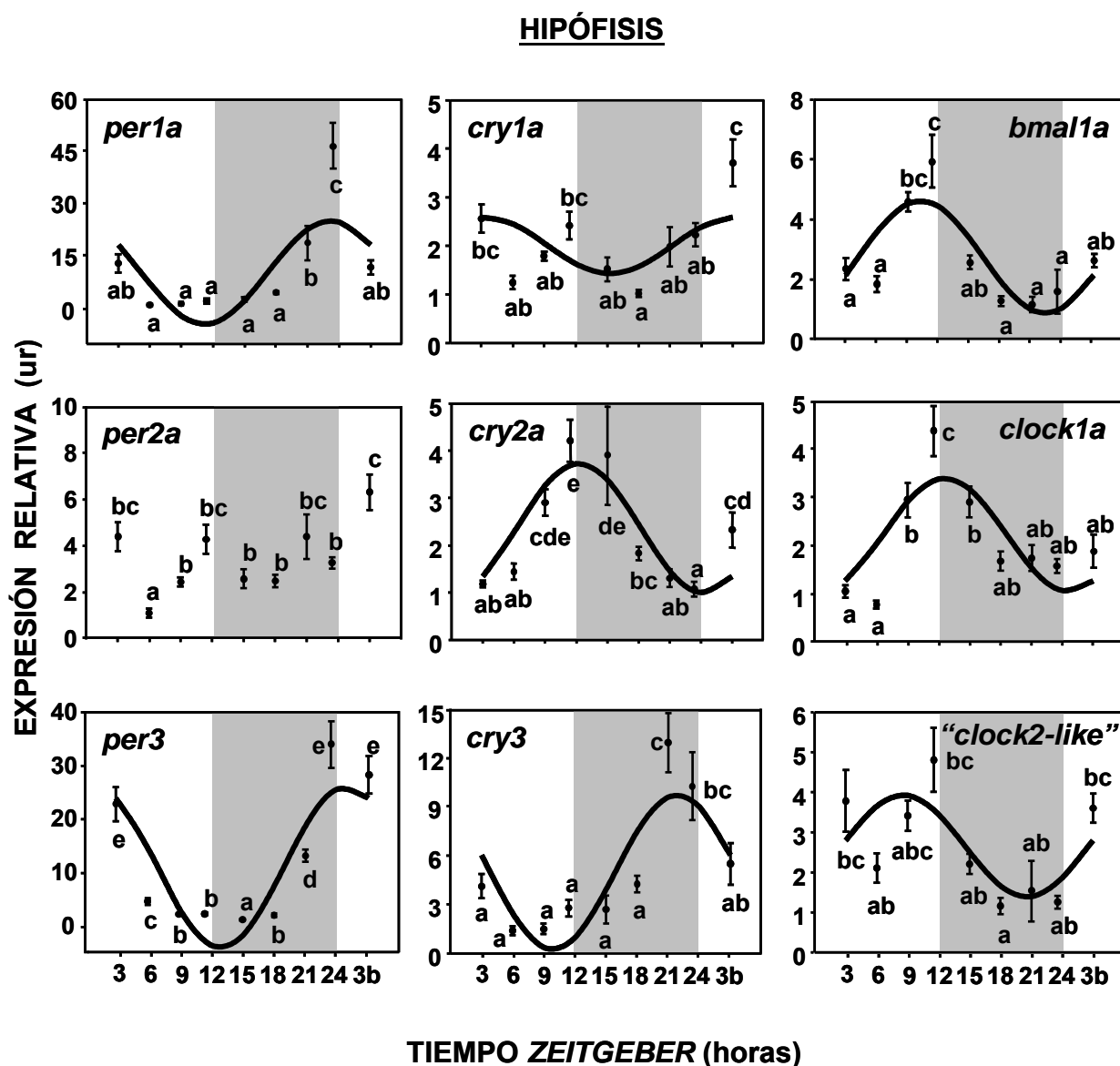


Figura 1.4. Expresión relativa de los genes reloj estudiados en la hipófisis de carpines mantenidos en condiciones de 12L:12D (encendido de las luces a las 7:30 h) y alimentación diaria a las 10:30 h. El área sombreada representa la fase oscura del fotociclo. Los datos se expresan como la media \pm e.e.m. ($n=8$ /hora de muestreo). Diferentes letras indican diferencias estadísticas ($p<0,05$). Las líneas negras gruesas muestran la función sinusoidal periódica ajustada a un ritmo cuando el análisis cosinor es significativo ($p<0,005$).

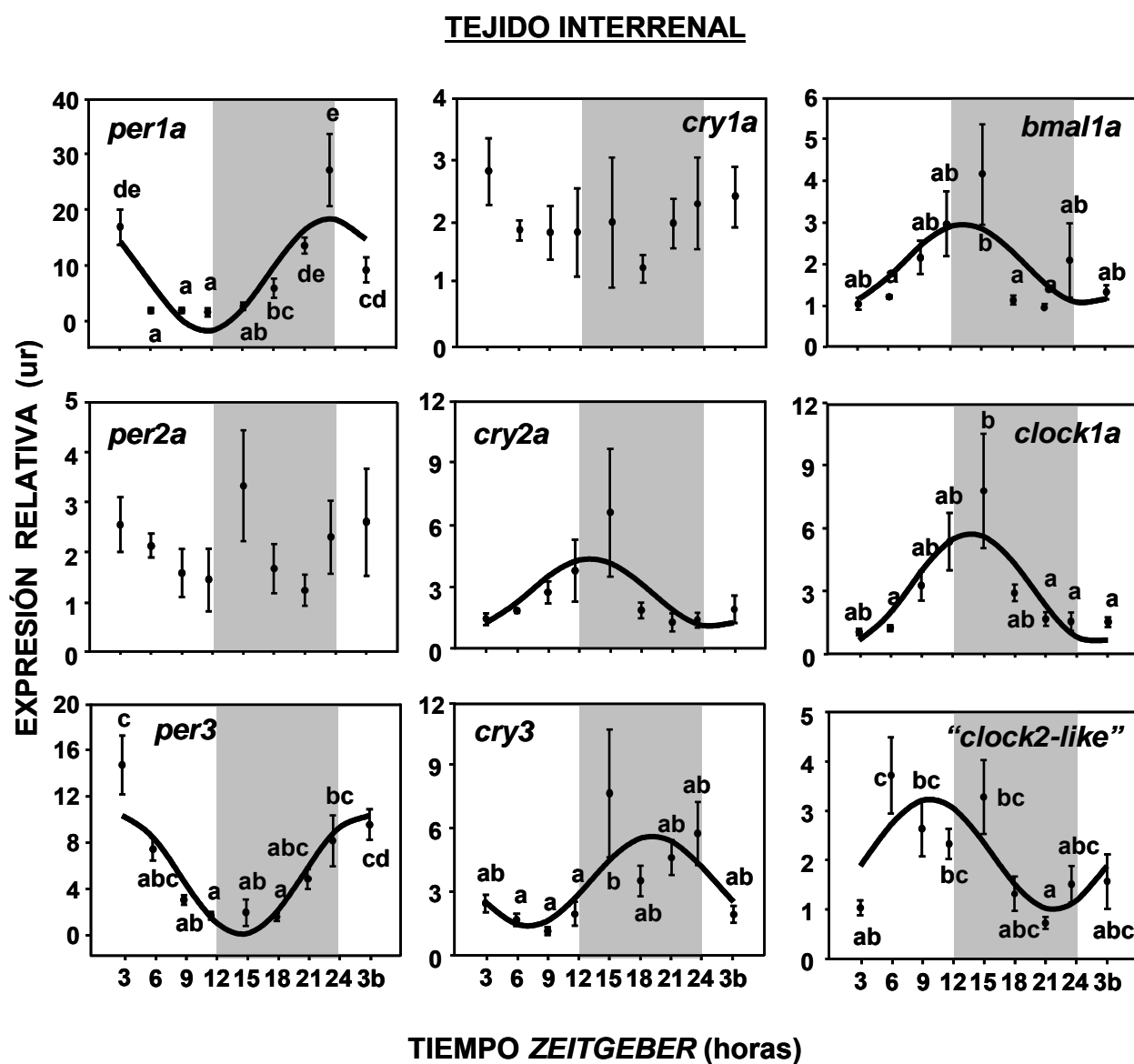


Figura 1.5. Expresión relativa de los genes reloj estudiados en el tejido interrenal de carpines mantenidos en condiciones de 12L:12D (encendido de las luces a las 7:30 h) y alimentación diaria a las 10:30 h. El área sombreada representa la fase oscura del fotociclo. Los datos se expresan como la media \pm e.e.m. ($n=8$ /hora de muestreo). Diferentes letras indican diferencias estadísticas ($p<0,05$). Las líneas negras gruesas muestran la función sinusoidal periódica ajustada a un ritmo cuando el análisis cosinor es significativo ($p<0,005$).

Con el fin de comparar las amplitudes y las acrofases que definen las funciones sinusoidales de los ritmos diarios significativos de un mismo gen en los tres tejidos estudiados, dichos parámetros también se han representado en forma de gráficas polares (Figuras 1.6 y 1.7). De forma general, las acrofases de los ritmos de expresión de cada gen son similares en el hipotálamo, la hipófisis y el tejido interrenal, mientras que sus amplitudes son variables entre los diferentes tejidos. Los genes *per1a*, *per3* y *cry3* muestran sus acrofases en la interfase oscuridad/luz en los tres tejidos analizados, aunque *cry3* en el tejido interrenal presenta una acrofase adelantada aproximadamente 3 h respecto al hipotálamo y la hipófisis (Figura 1.6). Estos ritmos están en antifase con los del gen *cry2a*, cuya expresión máxima se observa en la interfase luz/oscuridad. El gen *cry1a* presenta una acrofase similar en el hipotálamo y la hipófisis, en torno a 4 h después del inicio del periodo de luz, mientras que el gen *per2a* presenta su máximo de expresión en la mitad de la fotofase en el hipotálamo, que es el único tejido en el que este gen se expresa de manera rítmica.

Los tres genes del bucle positivo estudiados se expresan de manera rítmica a lo largo del eje HPI, mostrando los mayores valores de expresión cercanos a la interfase luz/oscuridad, o una acrofase ligeramente adelantada en el caso del gen "*clock2-like*" en tejidos centrales (en torno a ZT8) (Figura 1.7). Los ritmos de estos genes del bucle positivo coinciden con el ritmo de *cry2a*, que es el único gen del bucle negativo cuyo ritmo presenta una acrofase en la interfase luz/oscuridad.

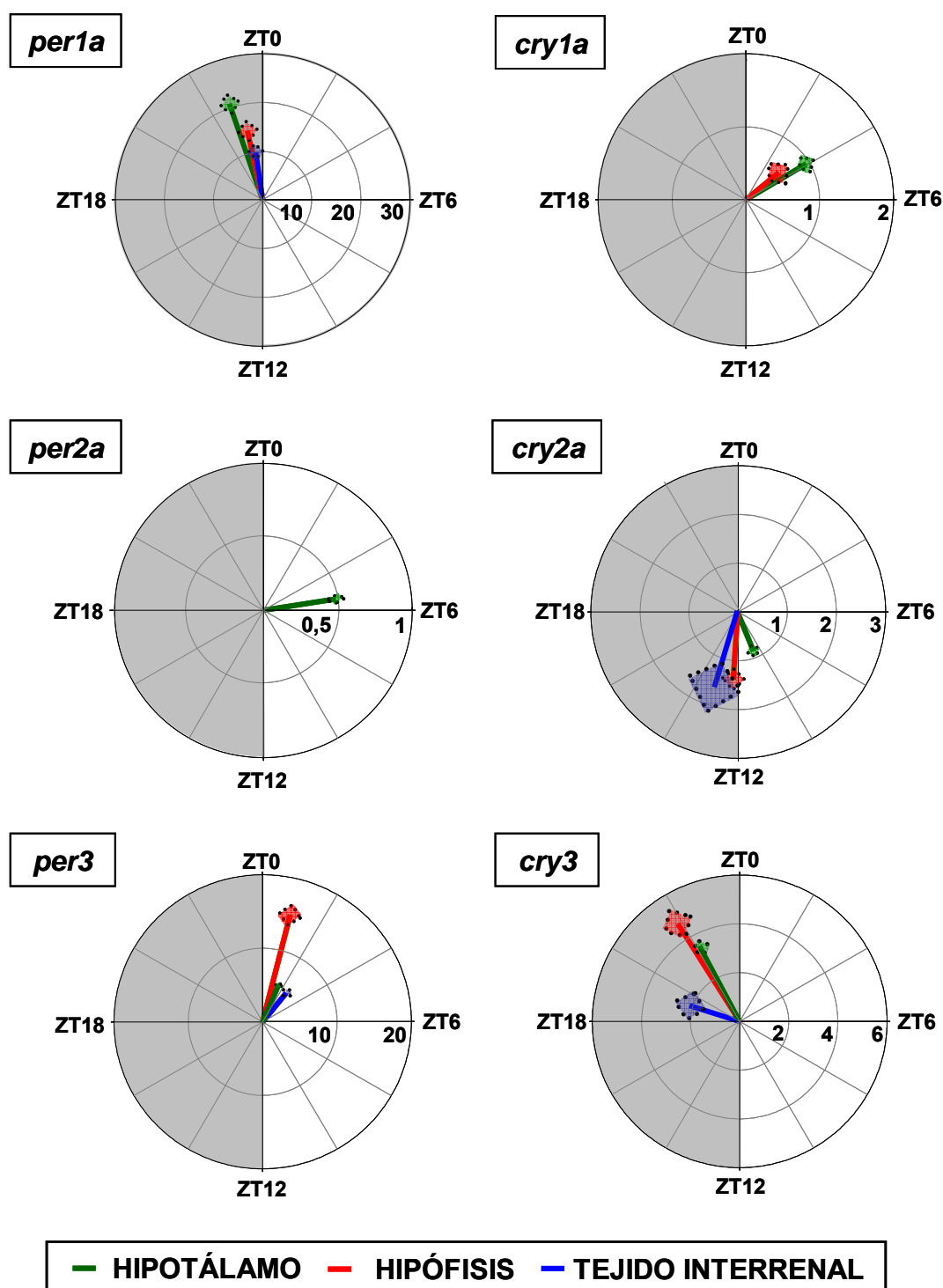


Figura 1.6. Gráficas polares que muestran las amplitudes y acrofases que definen las funciones sinusoidales de los ritmos significativos de expresión de los genes reloj del bucle negativo (*per1a*, *per2a*, *per3*, *cry1a*, *cry2a* y *cry3*) en el hipotálamo (línea verde), la hipófisis (línea roja) y el tejido interrenal (línea azul) de carpines mantenidos en condiciones de 12L:12D (encendido de las luces a las 7:30 h) y alimentación diaria a las 10:30 h. El área sombreada indica la fase oscura del fotociclo. La longitud del vector (eje radial) indica la amplitud del ritmo (unidades relativas). El ángulo del vector indica la acrofase, expresada en tiempo *zeitgeber* (ZT, horas). Los datos se expresan como la media \pm e.e.m. ($n=8$ /hora de muestreo). El e.e.m. de la amplitud y de la acrofase se representa por el área coloreada al final del vector.

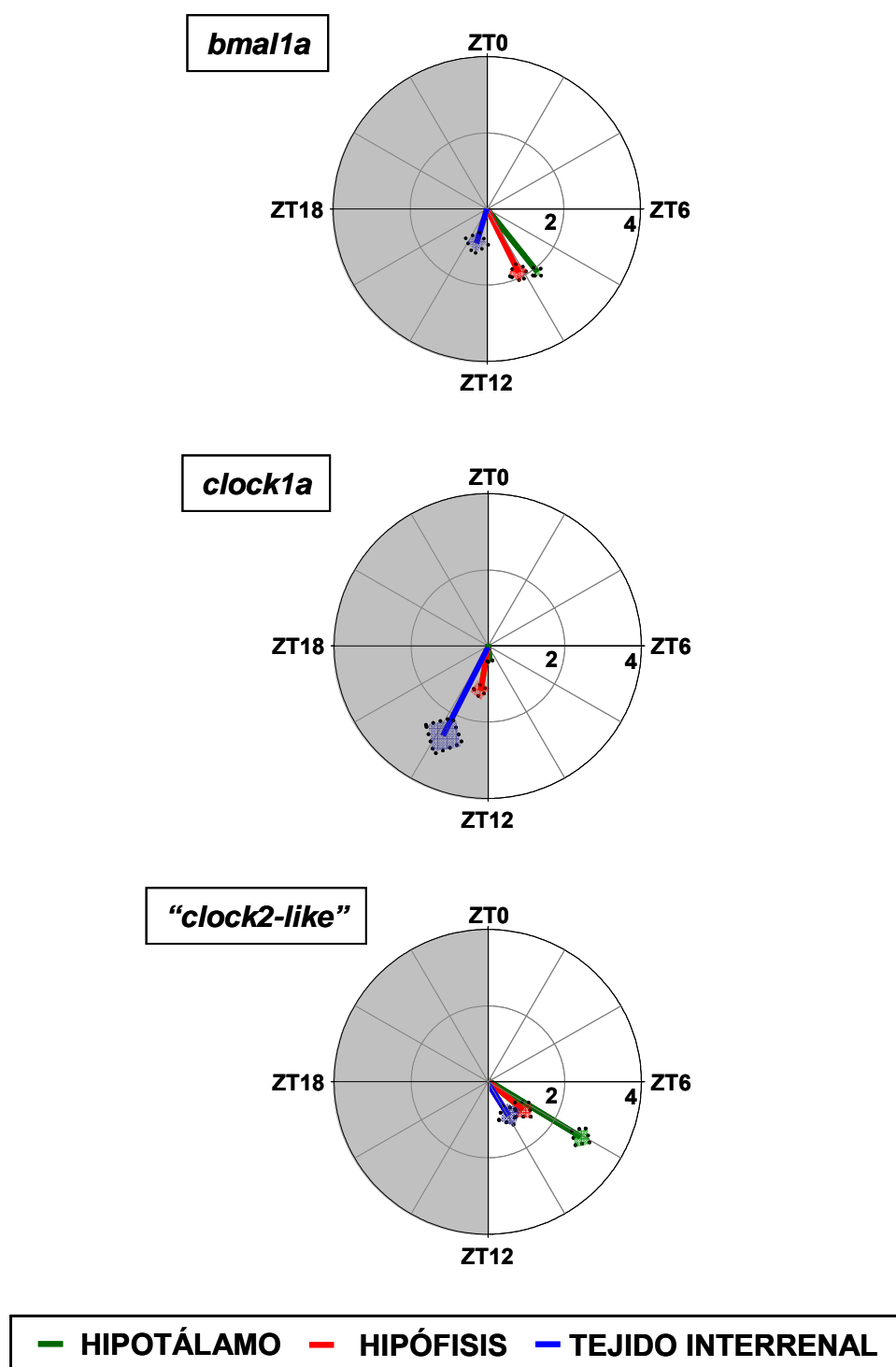


Figura 1.7. Gráficas polares que muestran las amplitudes y acrofases que definen las funciones sinusoidales de los ritmos significativos de expresión de los genes reloj del bucle positivo (*bmal1a*, *clock1a* y "clock2-like") en el hipotálamo (línea verde), la hipófisis (línea roja) y el tejido interrenal (línea azul) de carpines mantenidos en condiciones de 12L:12D (encendido de las luces a las 7:30 h) y alimentación diaria a las 10:30 h. El área sombreada indica la fase oscura del fotociclo. La longitud del vector (eje radial) indica la amplitud del ritmo (unidades relativas). El ángulo del vector indica la acrofase, expresada en tiempo *zeitgeber* (ZT, horas). Los datos se expresan como la media \pm e.e.m. ($n=8$ /hora de muestreo). El e.e.m. de la amplitud y de la acrofase se representa por el área coloreada al final del vector.

I.4. **DISCUSIÓN.**

Los resultados de este capítulo muestran, por primera vez en los peces, la caracterización simultánea de los ritmos diarios de expresión de genes funcionales del eje HPI y de genes reloj en presencia de los *zeitgebers* ciclo luz/oscuridad y horario fijo de alimentación diaria en los tres tejidos que componen dicho eje (hipotálamo, hipófisis y tejido interrenal), planteando la posibilidad de que el conjunto del eje HPI o cada componente individual del mismo sean osciladores del sistema circadiano del carpín.

Los perfiles de actividad locomotora registrada indican que los carpines del estudio están sincronizados a las condiciones experimentales (fotoperiodo 12L:12D y horario de alimentación fijo a las 10:00 h), ya que muestran un ritmo de actividad con una periodicidad de 24 h, con valores significativamente mayores durante la fotofase y una marcada actividad anticipatoria al alimento (FAA), lo que coincide con resultados obtenidos previamente para esta especie en condiciones experimentales similares (Sánchez-Vázquez *et al.*, 1996; Aranda *et al.*, 2001; Azpeleta *et al.*, 2010; Vivas *et al.*, 2011) y con los obtenidos en otros bloques de la presente Memoria (capítulos II y IV). El carpín también pueden mostrar patrones de actividad nocturnos e incluso una actividad elevada a lo largo de todo el fotociclo (Iigo y Tabata, 1996), lo que pone de manifiesto la gran plasticidad del sistema circadiano de este teleósteo. Tanto el ciclo luz/oscuridad como el horario de alimentación son dos importantes sincronizadores de la actividad locomotora en los peces, tal y como ocurre en nuestro estudio. En ausencia del *zeitgeber* alimentación, de forma general se considera que el carpín es una especie diurna, cuyos ritmos de actividad dependerían del LEO (Sánchez-Vázquez *et al.*, 1996), mientras que un horario diario fijo de alimentación sincroniza la actividad locomotora tanto en ausencia del *zeitgeber* fotoperiodo (en condiciones de luz continua; Sánchez-Vázquez *et al.*, 2001; Vera *et al.*, 2007; Feliciano *et al.*, 2011), como en condiciones de 12L:12D (Vivas *et al.*, 2011). La existencia de una interacción entre ambos *zeitgebers* para generar una salida (FAA, que a su vez es la evidencia de la existencia del FEO; Sánchez-Vázquez *et al.*, 1997) sugiere que el LEO y el FEO podrían estar acoplados en peces, al menos en el carpín (Aranda *et al.*, 2001). Entre las estructuras que constituyen el sistema multioscillatorio del LEO en los peces, cabe destacar a la retina y la glándula pineal, además del hipotálamo (Menaker *et al.*, 1997; López-Patiño *et al.*, 2011). En la actualidad se desconoce la localización anatómica exacta del FEO en los peces, aunque estudios recientes han demostrado la importancia del hipotálamo (estructura clave en la regulación central de la ingesta) en la sincronización por el alimento (Feliciano *et al.*, 2011). También se han propuesto otras regiones centrales, como el techo óptico, como posibles candidatos para albergar el FEO en los peces (Mazurais *et al.*, 1999, 2000; Feliciano *et al.*, 2011), así

como estructuras a nivel periférico, como el hígado o el intestino posterior (Feliciano *et al.*, 2011; Nisembaum *et al.*, 2012), sugiriendo que el FEO, al igual que el LEO, sería un sistema multioscilar en estos vertebrados.

Numerosos estudios han demostrado un ritmo circadiano en la respuesta del eje HPA al estrés en los mamíferos, que a menudo es explicada por la variación circadiana en los niveles plasmáticos de corticosteroides (véase revisión Kalsbeek *et al.*, 2012). En los peces, también se han demostrado oscilaciones diarias de cortisol, si bien éstas no solo dependen del ciclo luz/oscuridad, sino de factores como el horario de alimentación o la temperatura ambiental, entre otros. Así, se han descrito picos de producción durante la fase diurna (García y Meier, 1973; Spieler y Noeske, 1984; Boujard y Leatherland, 1992), nocturna (Redgate, 1974; Rance *et al.*, 1982; Pickering y Pottinger, 1983), durante ambos periodos (Peter *et al.*, 1978; Kühn *et al.*, 1986; Pavlidis *et al.*, 1999) o relacionados con los periodos de alimentación (Cerdá-Reverter *et al.*, 1998; Montoya *et al.*, 2010), si bien no se han demostrado ritmos diarios significativos en muchas de las especies investigadas. En peces, también se ha observado que la respuesta a un estrés agudo depende de la hora del día (Lankford *et al.*, 2003; Montoya *et al.*, 2011; López-Olmeda *et al.*, 2013). La primera hipótesis fue pensar que la ritmicidad del cortisol circulante venía determinada por un ritmo en alguno de los componentes del eje HPA: a nivel hipotalámico el CRF, a nivel hipofisario la ACTH y su precursor la POMC, y a nivel adrenal el MC2R (receptor de la ACTH) y factores implicados en la esteroidogénesis, como StAR. Según se ha ido analizando la posible ritmicidad circadiana de cada uno de estos componentes del eje HPA en los mamíferos se han encontrado resultados variados y a veces controvertidos, que claramente indican que la regulación circadiana del eje es compleja, resultando difícil predecir el patrón diario de la expresión de genes y la producción hormonal en los diferentes componentes de este eje fisiológico, aún cuando existen uniones funcionales entre ellos (Gilchrist *et al.*, 1998). A continuación discutiremos los resultados obtenidos en el carpín haciendo referencia a los datos científicos disponibles, casi exclusivos de mamíferos.

A nivel hipotalámico, no hemos encontrado un ritmo diario significativo en la expresión del *precursor de crf* en el carpín, desconociendo por el momento si otros mecanismos post-transcripcionales podrían regular la síntesis y secreción rítmica de este neuropéptido. Aunque en mamíferos sí se ha descrito un ritmo diario tanto en la expresión del CRF y de su precursor, como en los niveles circulantes del péptido, se ha demostrado un considerable grado de desacoplamiento con la secreción rítmica de ACTH y corticosteroides, encontrándose ambos en antifase o incluso siendo la liberación de ACTH anterior al incremento en la expresión de CRF (Garrick *et al.*,

1987; Kwak *et al.*, 1993; Fuchs *et al.*, 1996; Watts *et al.*, 2004; Girotti *et al.*, 2009). Dos estudios recientes realizados en peces sugieren también una gran complejidad en la regulación del eje HPI. Por un lado, en el lenguado se ha encontrado un ritmo diario en la expresión hipotalámica de CRF en fase con el ritmo de cortisol circulante; sin embargo, el incremento de cortisol en respuesta a un estrés agudo no siempre es acompañado por un incremento en la expresión de CRF (López-Olmeda *et al.*, 2013). De forma similar, los niveles de ARNm de CRF tampoco se correlacionan con el incremento de cortisol inducido por la exposición a agentes estresantes de diferente intensidad en la trucha (Jeffrey *et al.*, 2012). Todos estos datos parecen indicar que el control circadiano del eje HPA o HPI no ocurre exclusivamente a nivel de la expresión génica de CRF, pudiendo existir otros mecanismos reguladores de la actividad circadiana de dicho eje, producidos a nivel hipofisario y/o adrenal.

La expresión del receptor de CRF de tipo 1 muestra un patrón rítmico en el carpín, que no es acompañado por variaciones diarias en ninguno de los genes funcionales del eje HPI analizados en la presente Memoria, lo que sugiere que este ritmo en *crf-r1* podría no estar relacionado directamente con este eje, sino con otros efectos hipofisiotróficos del CRF. Por ejemplo, en los vertebrados no mamíferos, incluidos los peces, es conocido el papel del CRF en el eje hipotálamo-hipófisis-tiroideo, estimulando la síntesis de tirotropina hipofisaria (De Groef *et al.*, 2006). En mamíferos no hemos encontrado ningún estudio sobre los posibles ritmos diarios en la expresión de receptores de CRF, salvo un trabajo que ha demostrado un perfil rítmico en los sitios de unión del péptido en la hipófisis (Fuchs *et al.*, 1996). El hecho de que este perfil rítmico no esté correlacionado con los perfiles diarios circulantes de CRF y cortisol sugiere que la ritmicidad en los receptores de CRF no está directamente acoplada a la actividad del eje HPA.

Hasta el momento no se conoce la secuencia nucleotídica completa de la ACTH en el carpín, por lo que decidimos analizar los niveles de expresión de *pomc* como una medida indirecta de su expresión. Como consecuencia de la duplicación cromosómica ocurrida en los teleósteos (Jaillon *et al.*, 2004), en algunas especies se han identificado dos isoformas de *pomc* (Arends *et al.*, 1998; Leder y Silverstein, 2006; Kobayashi *et al.*, 2008), incluso tres en el lenguado barfin (*Verasper moseri*; Kobayashi *et al.*, 2008). En la carpa, ambas isoformas están presentes en la hipófisis (Arends *et al.*, 1998) y, por la cercanía filogenética con esta especie, sería muy probable que también existiesen en el carpín. En nuestro estudio, al no haber considerado la posible existencia de isoformas del gen, podríamos estar analizando únicamente la expresión de una de ellas, o bien ambas a la vez, lo que supone una limitación a la hora de interpretar nuestros resultados. El análisis de la ritmicidad circadiana en la expresión

de este gen indica que la hipófisis del carpín no presenta oscilaciones diarias significativas. En el lenguado, se ha descrito un ritmo diario en el gen de la *pomc-a* y *pomc-b*, aunque en antifase con respecto a los ritmos descritos para CRF y cortisol (López-Olmeda *et al.*, 2013), sugiriendo que ese ritmo en la expresión de *pomc* quizá no venga determinado por su papel en el eje HPI, y pueda estar más relacionado con la producción de otros péptidos que también derivan de este precursor, como la α -MSH o la β -endorfina. De forma similar, en la rata también se ha encontrado una relación inversa entre el ritmo diario en la expresión de *pomc* y el ritmo de corticosterona (Seres *et al.*, 2004). No obstante, los resultados en mamíferos son variados, ya que también en la rata se ha descrito un ritmo ultradiano de 8 h en la expresión de *pomc*, pero no un ritmo diario de 24 h (Girotti *et al.*, 2009), encontrando diferencias día/noche solo cuando los animales estaban en condiciones de alimentación restringida durante 3 h diarias, pero no en aquellos animales que se alimentaban *ad libitum*. En cualquier caso, son numerosos los estudios que indican que los cambios en los glucocorticoides no siempre dependen de cambios en los niveles de ACTH (Bornstein *et al.*, 2008; Son *et al.*, 2011), y aún existiendo ritmos diarios de corticosteroides en fase con los de ACTH, los primeros son ritmos robustos que no pueden ser generados únicamente por los ritmos de baja amplitud de la ACTH (Ulrich-Lai *et al.*, 2006).

Si para la producción rítmica de corticosteroides no es imprescindible una oscilación diaria de sus reguladores hormonales, como el CRF o la ACTH, una de las posibles explicaciones que se han propuesto en mamíferos es una modulación circadiana en la respuesta endocrina de la glándula adrenal (Son *et al.*, 2008). En este sentido, podemos pensar que la ritmicidad circadiana en la respuesta a la ACTH reside en oscilaciones rítmicas de su receptor, y efectivamente, tanto en condiciones 12L:12D (Kalsbeek *et al.*, 2012) como en oscuridad constante (Oster *et al.*, 2006a), se ha encontrado un ritmo circadiano en la expresión del gen de *mc2r*, con valores mínimos al inicio de la noche (o la noche subjetiva en el caso de condiciones DD). Sin embargo, en ambos estudios la expresión del gen *mc2r* solo presenta oscilaciones diarias de baja amplitud, que no serían suficientes para explicar los ritmos robustos de los esteroides adrenales. Una posible explicación es que estos ritmos robustos a nivel fisiológico fueran el resultado del efecto combinado de pequeñas oscilaciones a nivel transcripcional (Oster *et al.*, 2006a). Además, existe la posibilidad de una regulación post-transcripcional en cualquiera de los componentes de la cascada de señalización intracelular del receptor de ACTH, como la adenilato ciclasa o la proteína quinasa A, que transmiten directamente la señal de la ACTH a la maquinaria esteroideogénica (Oster *et al.*, 2006a). Esta posible regulación post-transcripcional explicaría los

resultados de un estudio reciente (Otsuka *et al.*, 2012) donde la expresión adrenal del gen *mc2r* no presenta cambios diarios en ratas mantenidas en condiciones de fotoperiodos cortos (8L:16D) o largos (16L:8D), y estaría en concordancia con los obtenidos en esta Tesis Doctoral, que indican también la ausencia de un ritmo diario significativo en la expresión del receptor de ACTH en el tejido interrenal del carpín en condiciones 12L:12D. Resultaría por tanto interesante estudiar la posible ritmicidad circadiana de elementos posteriores a la transcripción del receptor MC2R en los peces. En este sentido, es importante señalar que recientemente se ha demostrado el papel de las proteínas accesorias MRAP para la funcionalidad del MC2R en el pez cebra (Agulleiro *et al.*, 2010; Roy *et al.*, 2012), cuya posible ritmicidad circadiana también debería ser analizada.

En los últimos años, múltiples trabajos en mamíferos han centrado su atención en el estudio de los mecanismos que controlan el ritmo diario de corticosteroides en la propia adrenal, independientemente de la vía CRF-ACTH, demostrando la existencia de un reloj periférico en la glándula que juega un papel esencial en dicha producción rítmica de esteroides (véanse revisiones Oster *et al.*, 2006a; Kalsbeek *et al.*, 2012). Algunos autores han propuesto a StAR como la unión molecular entre los genes reloj de la adrenal y la síntesis circadiana de esteroides, en base a resultados que demuestran una expresión rítmica del gen *star* en fase con los ritmos de corticosteroides adrenales, y a que su expresión es regulada por la unión del dímero CLOCK/BMAL1 a las *E-box* de su promotor (Ulrich-Lai *et al.*, 2006; Son *et al.*, 2008; 2011; Girotti *et al.*, 2009; Otsuka *et al.*, 2012). No obstante, hay que tener en cuenta que no todos los estudios de mamíferos han podido demostrar una ritmicidad en la expresión de *star* (Oster *et al.*, 2006a, 2006b; Kalsbeek *et al.*, 2012), tal y como ocurre en el presente estudio en el carpín. Estos trabajos sugieren que el control de la producción de esteroides por el reloj adrenal no sería exclusivamente vía StAR, sino que se utilizarían múltiples rutas moleculares que de forma conjunta generarían los ritmos circadianos en la síntesis esteroidogénica de corticosteroides. Así, por ejemplo, en mamíferos se ha demostrado que la disponibilidad de colesterol como precursor esteroide desde la sangre puede ser controlada por una regulación circadiana de la expresión del receptor de la lipoproteína (*ldlr*) y de proteínas transportadoras (*scarb2*) (Oster *et al.*, 2006a). En los peces también existen datos que sugieren que la síntesis de cortisol puede ser regulada por mecanismos diferentes a la transcripción de *star*, ya que el incremento en los niveles plasmáticos del esteroide en respuesta a un agente estresante no siempre va acompañado de un incremento en la expresión del gen (Castillo *et al.*, 2008; Nematollahi *et al.*, 2009, 2012; Jeffrey *et al.*, 2012). Además de los mecanismos reguladores a nivel de la transcripción, hay que considerar que StAR

podría ser regulada también a nivel post-transcripcional, traduccional y post-traduccional, como ha sido demostrado previamente en los mamíferos (Fleury *et al.*, 1998; Artemenko *et al.*, 2001; Stocco *et al.*, 2005; Kusakabe *et al.*, 2009).

En relación a la expresión de genes reloj en el eje HPI del carpín, los tres tejidos analizados muestran de forma general un ritmo significativo en presencia de los *zeitgebers* ciclo luz/oscuridad (12L:12D) y horario fijo de alimentación diaria (ZT3). A continuación vamos a discutir los resultados obtenidos para cada uno de los genes reloj analizados en la presente Memoria, comenzando con los genes del bucle negativo (*per* y *cry*), y finalmente los genes del bucle positivo (*clock* y *bmal1*).

Los resultados del presente estudio en el carpín indican que la expresión rítmica de *per1a* está en fase en los tres tejidos estudiados (hipotálamo, hipófisis y tejido interrenal), con su acrofase inmediatamente anterior al inicio del periodo de luz (ZT22-23). Esta anticipación al inicio de la fotofase en la expresión de *per1a* es común en la mayoría de las especies de peces estudiadas y en diferente tejidos: en la retina del carpín (Velarde *et al.*, 2009a), del pez cebra (Cahill, 2002), de la trucha arco iris (López-Patiño *et al.*, 2011) y del lenguado (Martín-Robles *et al.*, 2011); en el cerebro completo del pez cebra (López-Olmeda *et al.*, 2010), de la lubina (Sánchez *et al.*, 2010; Del Pozo *et al.*, 2012) y del sigano (*Siganus guttatus*; Park *et al.*, 2007); en el hígado del pez cebra (López-Olmeda *et al.*, 2010) y del salmón (Huang *et al.*, 2010); y en larvas del pez cebra (Pando *et al.*, 2001). Además de anticipar el inicio de la fase luminosa, la expresión rítmica de este gen también anticipa la llegada de alimento en el carpín, como pone de manifiesto la presencia de un ritmo de expresión de *per1a* en hipotálamo, techo óptico, hígado (Feliciano *et al.*, 2011) e intestino (Nisembaum *et al.*, 2012) de este teleósteo en condiciones de luz continua y horario fijo de alimentación. Esta sincronización de *per1a* por el alimento también ha sido demostrada en diferentes tejidos en el pez cebra y el pez ciego cavernario *Phreatichthys andruzzii* (Cavallari *et al.*, 2011). En el diseño experimental realizado en la presente Tesis Doctoral coexisten los dos sincronizadores, ciclo luz/oscuridad (12L:12D) y horario fijo de alimentación (ZT3), no siendo posible averiguar la importancia relativa de cada uno de ellos en el ritmo de expresión de *per1a*. En cualquier caso, es posible que esta varíe en función de los tejidos, lo que justificaría las diferencias encontradas en la amplitud de los ritmos. Así, la amplitud del ritmo de expresión de *per1a* es más dependiente del horario de alimentación en tejidos periféricos, como el hígado y el intestino, que en tejidos centrales en el carpín, donde probablemente el ciclo luz/oscuridad sea más importante (Feliciano *et al.*, 2011; Nisembaum *et al.*, 2012). También en el presente estudio hemos encontrado diferencias en la amplitud de los ritmos, siendo menor en el tejido interrenal que en el hipotálamo.

Una anticipación a la luz ha sido también sugerida para *per3*, basándose en su patrón rítmico de expresión, que presenta máximos en las últimas horas de la escotofase o en la interfase oscuridad/luz en diferentes tejidos y especies de teleósteos analizadas: pez cebra (Delaunay *et al.*, 2000), lenguado (Martín-Robles *et al.*, 2011) y carpín (Velarde *et al.*, 2009a; presentes resultados). Estudios recientes realizados en tejidos periféricos como el hígado (Feliciano *et al.*, 2011) y el intestino (Nisembaum *et al.*, 2012) del carpín han sugerido que *per3* es sincronizado por la alimentación, aún en presencia de un fotociclo. De hecho, la acrofase del ritmo de *per3* coincide a la misma hora del día, en animales mantenidos en fotoperiodos muy distintos (12L:12D, 12D:12L, 24L y 24D), aunque probablemente exista una interacción de los dos *zeitgebers*, ya que la amplitud del ritmo es menor en condiciones de iluminación constante que en presencia de un fotociclo (Nisembaum *et al.*, 2012). Esto podría explicar por qué en los resultados de este trabajo la acrofase de *per3* (ZT1-2,5) está ligeramente retrasada respecto a *per1* (ZT22-23), ya que la llegada del alimento ocurre 3 h después del encendido de las luces, sugiriendo que *per3* podría anticipar la hora de alimentación más que la luz.

En el pez cebra se ha demostrado que *per2* es un gen inducible por la luz, con unos niveles máximos de expresión durante el día en diferentes tejidos (Pando *et al.*, 2001; Cahill, 2002; Vatine *et al.*, 2009). En el promotor del gen se ha descrito un módulo de respuesta a la luz (LRM) que contiene elementos *D-box* y *E-box* responsables de la transcripción regulada por el oscilador endógeno y de la inducida por la luz, respectivamente, de modo que existe una jerarquía: en ausencia de luz el gen sería regulado por el oscilador, mientras que si hay luz su expresión se induce enmascarando la regulación circadiana (Vatine *et al.*, 2009, 2011). Resultados de nuestro grupo de investigación en el carpín también apoyan que *per2a* es un gen inducible por la luz en esta especie: la expresión del gen aumenta después del encendido de las luces en la retina (Velarde *et al.*, 2009a) y el hipotálamo (resultados de la presente Tesis Doctoral) en peces mantenidos en condiciones de fotoperiodo 12L:12D y horario fijo de alimentación, presentando en ambos casos la acrofase en la mitad del periodo de luz, mientras que este ritmo se pierde en el cerebro en condiciones de luz constante (Feliciano *et al.*, 2011). Aunque aún no se ha clonado el promotor de *per2* en el carpín, es probable que también exista un LRM, ya que se trata de una región muy conservada en los vertebrados (Vatine *et al.*, 2011; Idda *et al.*, 2012), incluido el pez ciego cavernario, un ciprínido ciego cuyo reloj circadiano no responde a la luz (Cavallari *et al.*, 2011). El ritmo diario en la expresión de *per2a* presente en el hipotálamo no se ha observado ni en la hipófisis ni en el tejido interrenal del carpín, lo que sugiere que *per2a* es importante en los relojes fotosensibles. En este

sentido se ha demostrado recientemente en el lenguado que *per2* es inducible por la luz en el diencéfalo y el techo óptico (Martín-Robles *et al.*, 2012), estructuras que reciben proyecciones retinianas y pineales (ambas estructuras fotorreceptoras) y que pueden presentar fotorreceptores (Falcón *et al.*, 2010), no mostrando un ritmo diario significativo en otros tejidos como el hígado. Por otra parte, la expresión de *per2a* en el intestino del carpín, un tejido probablemente no fotosensible, no está inducida directamente por la luz, sugiriendo que dependería del oscilador endógeno, al menos en presencia de un fotoperiodo y un régimen de alimentación aleatoria (Nisembaum *et al.*, 2012). Todos estos datos sugieren que la regulación de la expresión de *per2a* puede ser diferente en función del tejido, siendo inducida por la luz en osciladores fotosensibles, y probablemente por el horario de alimentación en osciladores periféricos no sensibles directamente a la luz, como también se ha propuesto en mamíferos (Hirao *et al.*, 2010; Oike *et al.*, 2011; Tahara *et al.*, 2011).

Los genes *cry* presentan una expresión rítmica en los tres tejidos analizados (hipotálamo, hipófisis y tejido interrenal) en el carpín, y el patrón temporal de oscilación varía significativamente entre los distintos genes de la familia, confirmando los estudios de Kobayashi y colaboradores (2000) en el pez cebra. Así, la expresión de *cry1a* es alta durante la mañana, con una caída por la noche, incrementando de nuevo al amanecer, mientras que *cry2a* presenta un pico de máxima expresión al atardecer, en antifase con *cry3*, cuya acrofase se sitúa al amanecer. Estos resultados sugieren que cada gen *cry* tiene posiblemente un papel distinto en el reloj circadiano de los peces (Idda *et al.*, 2012). Por el momento sabemos que el grupo formado por los genes *cry1* y *cry2* en el pez cebra funciona de forma similar a los *cry* de mamíferos, inhibiendo la transcripción mediada por el dímero CLOCK:BMAL1, mientras que *cry3* y *cry4* formarían otro grupo funcionalmente distinto, clasificado como *cry* tipo *Drosophila*, que no inhibe la activación de CLOCK:BMAL1 (Kobayashi *et al.*, 2000; Vatine *et al.*, 2011). También puede haber diferencias en función del tejido (Kobayashi *et al.*, 2000), como sucede en nuestro estudio para *cry1a*, cuyo patrón rítmico es similar en el hipotálamo y, con menor amplitud, en la hipófisis, pero no presenta un ritmo diario significativo en el tejido interrenal. Estos resultados corroboran los obtenidos en un estudio previo en la misma especie bajo condiciones experimentales similares (Velarde *et al.*, 2009a), en el que tampoco se encontró una expresión rítmica de *cry1a* en tejidos periféricos como el hígado o el intestino, pero sí en la retina, sugiriendo una mayor relevancia de este gen en la ritmicidad de tejidos centrales, de forma similar a lo descrito para *per2* en la presente Memoria. El hecho de que en condiciones de iluminación continua y con un horario fijo de alimentación diaria, la expresión de *cry1* no sea rítmica en el cerebro del pez cebra (Sánchez y Sánchez-Vázquez, 2009) y el

techo óptico o el hipotálamo del carpín, pero sí muestre un ritmo diario en el hígado de esta última especie (Feliciano *et al.*, 2011), puede apuntar a que la luz sea un sincronizador más potente que el horario de alimentación para *cry1a* en tejidos centrales, mientras que en ausencia de un ciclo luz/oscuridad sea el horario de alimentación el que pueda funcionar como sincronizador en tejidos periféricos como el hígado. El ritmo de *cry2a* en todos los tejidos estudiados es similar, con la acrofase al final del día, lo que coincide con resultados previos en la retina de esta especie (Velarde *et al.*, 2009a), aunque no con lo descrito en hígado e intestino en condiciones similares de fotoperiodo y alimentación. Es posible que los tejidos gastrointestinales se vean influenciados por otros muchos factores metabólicos/energéticos (Konturek *et al.*, 2011), a los que los tejidos estudiados en este trabajo sean menos sensibles.

Aunque por el momento no se tiene mucha información sobre el papel de *cry3* en el reloj molecular de los peces, se conoce que su perfil rítmico es similar al presentado por *per1a*, tanto en localizaciones centrales como periféricas del carpín, anticipando ambos *zeitgebers* (Velarde *et al.*, 2009a; Feliciano *et al.*, 2011; Nisembaum *et al.*, 2012; presentes resultados). Es posible que este gen juegue un papel relevante en el funcionamiento del reloj molecular en tejidos periféricos, ya que es un gen muy abundante en el intestino y el hígado, y presenta una fuerte sincronización por el horario de alimentación, aún en presencia de un ciclo luz/oscuridad (Feliciano *et al.*, 2011; Nisembaum *et al.*, 2012).

En cuanto a los genes del bucle positivo, en nuestro estudio encontramos que todos ellos presentan una expresión rítmica diaria, con un aumento durante la última parte del día y máximos de expresión en torno a la interfase luz/oscuridad (ZT9-13), alcanzando los valores más bajos del ritmo en horas próximas al amanecer, en los tres tejidos del eje HPI. Estos resultados confirman un patrón rítmico similar de la expresión de *bmal* y *clock* en otras especies de teleósteos, tanto en tejidos centrales y periféricos del pez cebra (Whitmore *et al.*, 1998; Cermakian *et al.*, 2000), como en el cerebro del salmón atlántico (Davie *et al.*, 2009) y en el hipotálamo y la retina de la trucha (López-Patiño *et al.*, 2011). A la vista de estos resultados parece que el perfil de expresión de los genes del bucle positivo está muy conservado entre los teleósteos (Cahill, 2002; Idda *et al.*, 2012), aunque difiere de los resultados previamente publicados en mamíferos y *Drosophila*. Concretamente en mamíferos, la expresión del gen *clock* es constante durante todo el ciclo circadiano, y el gen *bmal1*, que sí se expresa rítmicamente, muestra sus valores máximos de expresión en la segunda mitad de la escotofase (Shearman *et al.*, 1999, 2000). En el caso de *Drosophila*, es el gen *clock*, y no *bmal*, quien se expresa de manera rítmica, con su acrofase en la interfase oscuridad/luz (Williams, 2004). Por tanto, existen variaciones a lo largo de la

filogenia que pueden responder a diferentes mecanismos reguladores o diferentes funciones de estos genes reloj del bucle positivo.

Al comparar el patrón temporal de expresión de genes reloj entre especies diurnas (pez cebra: Cahill, 2002; carpín: Velarde *et al.*, 2009a; Feliciano *et al.*, 2011; presentes resultados) y nocturnas (lenguado: Martín-Robles *et al.*, 2011, 2012), se observa que en general es bastante similar, sugiriendo su independencia del cronotipo de las especies, de forma similar a lo descrito en mamíferos. Incluso en un estudio realizado en peces cebra aclimatados a una alimentación diurna o nocturna, se observa un patrón diario de expresión de *per1* similar en el cerebro, independientemente del patrón comportamental de los peces (diurno o nocturno, respectivamente), que viene determinado por el horario de alimentación (López-Olmeda *et al.*, 2010). Todos estos datos refuerzan la idea de que las diferencias entre animales diurnos y nocturnos derivan de mecanismos posteriores a los osciladores neurales (Challet, 2007; Martín-Robles *et al.*, 2011).

En resumen, los genes reloj analizados en el presente estudio muestran un patrón diario de expresión en cada uno de los componentes anatómicos del eje HPI (hipotálamo, hipófisis y tejido interrenal) en el carpín y, en todos ellos, de forma general, las acrofases de los ritmos de los genes del bucle negativo están en antifase con los ritmos de los genes del bucle positivo. Estos datos sugieren que cada uno de los tejidos que componen el eje HPI podría ser un oscilador funcional, constituyendo un “nodo” en la red del sistema circadiano del carpín. Los resultados descritos previamente en mamíferos son similares (Oster *et al.*, 2006b; Son *et al.*, 2008; Torres-Farfán *et al.*, 2008; Valenzuela *et al.*, 2008), incluido el único estudio en el que se analiza de forma simultánea la expresión de genes reloj en los tres tejidos que componen el eje HPA en ratón, encontrando un ritmo significativo de expresión de los genes *per1*, *per2* y *bmal1* en el núcleo paraventricular hipotalámico (NPV), en la hipófisis anterior y en la corteza adrenal, con los ritmos de los genes del bucle negativo en antifase con los del bucle positivo (Girotti *et al.*, 2009). La relevancia de nuestro trabajo, así como el de Girotti y colaboradores, es la caracterización simultánea de los ritmos de la expresión de genes reloj en los tres componentes del eje HPI o HPA, respectivamente. En este sentido, cabe destacar que los ritmos de los genes reloj en ratones están en fase en la hipófisis y la corteza adrenal, y desfasados respecto a los ritmos presentes en tejidos centrales como el núcleo paraventricular y el NSQ (Girotti *et al.*, 2009), mientras que en el carpín el patrón temporal de los genes reloj es muy similar en los tres tejidos del HPI. Estos datos ponen de manifiesto una vez más que la organización circadiana en los peces puede diferir en determinados

aspectos respecto al modelo de los mamíferos, donde se acepta una jerarquía impuesta por el NSQ (Menaker *et al.*, 1997).

Es importante señalar que, aunque el hallazgo de oscilaciones rítmicas en la expresión de los genes reloj puede considerarse un indicador de la presencia de un oscilador, no necesariamente implica que este oscilador sea funcional *in vivo*. Para ello, tienen que existir genes controlados por los productos proteicos de estos genes reloj, denominados genes controlados por el reloj (CCGs), y que constituyen la salida del mismo. Uno de los genes funcionales del eje HPA en mamíferos que algunos autores han propuesto como candidato a CCG ha sido el gen *star*, ya que se demostró que posee en su promotor sitios de unión (*E-box*) al dímero CLOCK-BMAL1, el cual estimula su expresión (Ulrich-Lai *et al.*, 2006; Son *et al.*, 2008, 2011; Girotti *et al.*, 2009; Otsuka *et al.*, 2012), y en base a que *cry2* está involucrado en la producción de cortisol en respuesta a la ACTH a través de una estimulación de la transcripción de *bmal1* y en consecuencia de *star* en el mono capuchino (Torres-Farfán *et al.*, 2009). El hecho de que en nuestro estudio tanto *cry2a* como *bmal1a* se expresen de manera rítmica podría sugerir que, al igual que ocurre en mamíferos, ambos genes estuviesen implicados en una posible regulación diaria de la esteroidogénesis en el tejido interrenal del carpín, si bien la expresión de *star* no ha revelado un patrón rítmico diario en esta especie. No obstante, en otros estudios realizados en mamíferos el gen *star* tampoco parece mostrar ritmicidad (Oster *et al.*, 2006a, 2006b; Kalsbeek *et al.*, 2012), lo que se ha justificado en base a una necesidad rápida de esta proteína en la respuesta al estrés agudo, y que excluiría a este gen de un control circadiano, imponiéndose el control del reloj sobre otras etapas de la ruta biosintética (Dickmeis y Foulkes 2011).

Hay que tener en cuenta que los ritmos de los genes reloj descritos en los tejidos que componen el eje HPI, además de poder reflejar un eje con funcionalidad circadiana, podrían estar relacionados con otras funciones rítmicas controladas de forma independiente por cada componente del eje. En este sentido, considerando el papel del hipotálamo como regulador de la ingestión de alimento en los peces (De Pedro y Björnsson, 2001; Volkoff *et al.*, 2009) y como parte del sistema circadiano de estos vertebrados (Feliciano *et al.*, 2011), podemos pensar que los ritmos de los genes reloj en este tejido estén más relacionados con los ritmos de factores reguladores de la ingesta (NPY, orexinas, monoaminas, etc.; Hoskins y Volkoff, 2012), que con su papel en la ritmicidad del eje HPI. En relación con la hipófisis, esta glándula forma parte de otros muchos ejes endocrinos en los vertebrados además del HPA, como el eje hipotálamo-hipófisis-tiroideo o hipotálamo-hipófisis-gonadal, pudiendo estar implicada por tanto en las variaciones circadianas de otras hormonas (Norris, 1997). En el caso

del tejido interrenal, los ritmos de los genes reloj, además de regular directamente la actividad biosintética de corticoides y el componente circadiano de la respuesta al estrés, pueden a su vez controlar numerosas funciones como la homeostasis energética, el metabolismo, el balance mineral y la reproducción, tal y como se ha sugerido en los mamíferos (Oster *et al.*, 2006b). De hecho, el reloj periférico de la adrenal se ha considerado no tanto como un “generador” de ritmos, sino más bien como un modulador y estabilizador de los ritmos circadianos fisiológicos (Oster *et al.*, 2006b; Son *et al.*, 2011). Todos estos datos no hacen sino revelar el trabajo de investigación que aún queda por hacer en los peces.

Por último, además de la regulación circadiana del eje HPA, hay suficientes datos en mamíferos que apoyan que este eje influye de manera recíproca sobre la actividad del sistema circadiano (Nader *et al.*, 2010; Son *et al.*, 2011; Pezük *et al.*, 2012). Es conocido que los glucocorticoides modifican la expresión de genes reloj en diferentes tejidos, sugiriendo que servirían como reajuste periódico de los relojes, lo que puede resultar particularmente importante durante el estrés, cuando el organismo necesita ajustar los ritmos circadianos a la actividad demandada para responder a una situación de estrés (Nader *et al.*, 2010). En los peces, la información sobre estas interacciones fisiológicas mutuas entre el sistema circadiano y el eje HPI es limitada por el momento, y en este sentido nuestro grupo de investigación ha iniciado en la actualidad estudios encaminados a conocer el posible papel del cortisol sobre la expresión de los genes reloj en el carpín.

CAPÍTULO II

**TRATAMIENTOS CON MELATONINA Y EJE HIPOTÁLAMO-
HIPÓFISIS-INTERRENAL: EFECTOS EN LA EXPRESIÓN
GÉNICA, CORTISOL Y ACTIVIDAD LOCOMOTORA**

RESUMEN II

La melatonina ha sido propuesta como una hormona sedante, al reducir la actividad locomotora en diversas especies de vertebrados, incluidos los peces, en los que este efecto parece depender del cronotipo de la especie, observándose una reducción de la actividad locomotora en el carpín (diurno), pero no en la tenca (nocturna), tras una inyección aguda de esta hormona. Por otro lado, la melatonina regula la ingesta en los peces, actuando como señal periférica de saciedad y, en varias especies de vertebrados, ha sido propuesta como regulador de la esteroidogénesis adrenal y de la liberación de cortisol. Por todo ello, el objetivo general de este capítulo es caracterizar los efectos de la melatonina sobre parámetros comportamentales (actividad locomotora e ingesta) y de respuesta a estrés (niveles plasmáticos de cortisol, glucosa y lactato, y expresión de genes funcionales del eje hipotálamo-hipófisis-interrenal) en el carpín en condiciones basales y de exposición a estrés.

El primer objetivo de este capítulo es profundizar en los efectos de la inyección repetida de melatonina sobre la actividad locomotora y los niveles plasmáticos de cortisol en el carpín, comparando dos vías de administración: periférica (intraperitoneal, 10 µg/g) y central (intracerebroventricular, 1 µg/µl) durante 7 y 4 días, respectivamente. Los resultados obtenidos muestran que la administración intraperitoneal, pero no intracerebroventricular, de melatonina reduce significativamente los niveles circulantes de cortisol y la actividad locomotora diaria (incluyendo las actividades diurna, nocturna y anticipatoria al alimento-FAA), indicando un papel periférico relevante de esta hormona en la regulación de ambos parámetros. La reducción de la FAA (parte de la primera fase del comportamiento alimentario), corrobora el importante papel de la melatonina en la regulación de la ingesta en el carpín, actuando tanto en las fases tempranas de la conducta alimentaria como en la fase posterior de ingestión del alimento.

Teniendo en cuenta el efecto anorético de la melatonina en el carpín, con el segundo objetivo de este capítulo se pretende dilucidar si dicha reducción de la ingesta podría ser responsable de la disminución de la actividad locomotora inducida por la hormona. Una restricción alimentaria (50% de la ración habitual de alimento) durante 10 días no modifica significativamente ni la actividad locomotora diaria ni los niveles plasmáticos de cortisol, indicando que la acción periférica de la hormona disminuyendo la actividad locomotora en el carpín no es una consecuencia directa de su efecto anorético.

A continuación, se estudian los posibles efectos de la administración intraperitoneal de melatonina (2 o 20 µg/g) en las respuestas a un modelo de estrés agudo (1 min de exposición al aire) en el carpín. La exposición al estrés incrementa el cortisol circulante y reduce la ingesta, sin producir modificaciones significativas ni en la glucemia ni en la actividad locomotora. La administración de melatonina revierte ambos efectos a las 2 h de la inyección, observándose además una reducción de la actividad locomotora a las 2,5 y 24 h posteriores. Los resultados de este estudio señalan a la melatonina como posible hormona anti-estrés en el carpín.

Finalmente, se investiga si estas acciones de la melatonina pueden realizarse a través del eje hipotálamo-hipófisis-interrenal, valorando posibles cambios en la expresión de algunos genes funcionales del mismo: *precursor de crf* en el hipotálamo, *crf-r1* y *pomc* en la hipófisis y *mc2r* y *star* en el riñón. La administración de melatonina (20 µg/g) durante 4 días revierte el incremento en la expresión de *star* inducida por la exposición a un protocolo de estrés agudo (5 min de manipulación), sugiriendo que el tejido interrenal puede ser una posible diana para la acción anti-estrés de esta hormona.

El conjunto de resultados de este capítulo muestra que la melatonina ejerce un efecto sedante en el carpín tanto en condiciones basales como estresantes, sugiriendo un alto grado de conservación de esta función en especies diurnas a lo largo de la filogenia. Además, se propone al tejido interrenal como una de las posibles dianas a través de las cuales la melatonina podría realizar su acción relajante.

SUMMARY II

Melatonin has been proposed as a relaxing hormone, as it reduces locomotor activity in several vertebrate species, including fish. This effect seems to depend on the fish species chronotype, with a decrease of locomotor activity in goldfish (diurnal), but not in tench (nocturnal), after an acute injection of melatonin. On the other hand, melatonin also regulates food intake in fish, acting as a peripheral signal of satiety. Moreover, melatonin has been proposed as a regulator of adrenal steroidogenesis and cortisol release in several vertebrate species. Therefore, the general aim of this chapter is to characterize the effects of melatonin on behavioural (locomotor activity and food intake) and stress response parameters (plasma levels of cortisol, glucose and lactate, and expression of hypothalamus-pituitary-interrenal axis functional genes) in goldfish under basal and stressful conditions.

The first objective of this chapter is to delve into the effects of repeated injections of melatonin on locomotor activity and plasma cortisol levels in goldfish, by comparing two ways of administration: peripheral (intraperitoneal, 10 µg/g) *versus* central (intracerebroventricular, 1 µg/µl) for 7 and 4 days, respectively. The obtained results show that intraperitoneal administration of melatonin, but not intracerebroventricular, significantly reduces circulating cortisol levels and daily locomotor activity (including diurnal, nocturnal and food anticipatory activity-FAA), indicating a relevant peripheral role of this hormone in the regulation of both parameters. The reduction of FAA (part of the first phase of eating behavior) corroborates the important role of melatonin in feeding regulation in goldfish, acting both in the early phase of feeding behaviour and in the ingestion phase.

Taking into account the anorectic effect of melatonin in goldfish, the second objective of this chapter is to elucidate whether such feeding reduction could be responsible for the hormone-induced decrease of locomotor activity. Food restriction (50% of usual food ration) for 10 days does not significantly modify either daily locomotor activity or plasma cortisol levels, indicating that the peripheral action of the hormone decreasing locomotor activity in goldfish is not a direct consequence of its anorectic effect.

Next, the possible effects of intraperitoneal administration of melatonin (2 or 20 µg/g) on the physiological responses to acute stress (1 min of air exposure) have been studied in goldfish. Stress exposure increases circulating cortisol and reduces food intake, without any significant change in glycemia and locomotor activity. Melatonin administration counteracts both effects 2 h after the injection, showing also a reduction of locomotor activity at both 2.5 and 24 h post-injection. Altogether these results reveal

melatonin as a possible anti-stress hormone in goldfish.

Finally, we investigate whether these actions of melatonin can be mediated through the hypothalamus-pituitary-interrenal axis, assessing possible changes in the expression of some functional genes of the axis: *crf precursor* in the hypothalamus, *crf-r1* and *pomc* in the pituitary, and *mc2r* and *star* in the kidney. Melatonin administration (20 µg/g) during 4 days reverses the increase of *star* expression induced by exposure to an acute stress protocol (5 min of handling), suggesting that interrenal tissue can be a possible target for the anti-stress action of this hormone.

Altogether the results of this chapter show that melatonin exerts a sedative effect in goldfish under both basal and stressful conditions, suggesting a high degree of conservation of this function in diurnal species throughout phylogeny. Besides, interrenal tissue is proposed as one of the possible targets by which melatonin could exert its relaxing action.

II.1. OBJETIVO.

Los experimentos del presente capítulo intentan caracterizar posibles efectos *in vivo* de la MEL sobre parámetros comportamentales y plasmáticos en el carpín, tanto en condiciones basales como en situaciones de estrés. Asimismo, se pretende conocer si la hormona modifica la expresión de genes clave en la activación del eje HPI.

II.2. EFFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN IP E ICV DE MELATONINA SOBRE LA ACTIVIDAD LOCOMOTORA Y LOS NIVELES PLASMÁTICOS DE CORTISOL.

II.2.1. DISEÑOS EXPERIMENTALES.

El objetivo de este diseño es comparar el efecto de la administración de MEL sobre la actividad locomotora y los niveles plasmáticos de cortisol comparando dos vías de administración: IP e ICV. Las condiciones de fotoperiodo y alimentación utilizadas durante el experimento son las mismas que en el periodo de aclimatación (apartado 1.3.1. de la sección de Materiales y métodos).

a) Administración IP de melatonina.

Se dividió a los carpines ($40,9 \pm 1,4$ g) en dos grupos experimentales ($n=10/\text{grupo}$, 5 peces/acuario). Uno de los grupos fue inyectado IP durante 7 días con solución salina de teleósteos ($10 \mu\text{l/g pc}$), y el otro grupo fue inyectado IP durante 7 días con MEL ($10 \mu\text{g/g pc}$). La dosis de la hormona se eligió en base a resultados previos en el carpín (Pinillos *et al.*, 2001). Las inyecciones se realizaron 1 hora antes del inicio de la fase oscura (17:30-18:00 h). La actividad locomotora se registró de forma ininterrumpida a lo largo de todo el estudio.

Al final del tratamiento (tras 24 horas de ayuno y 17 horas de la última inyección) se obtuvieron muestras de sangre para cuantificar los niveles plasmáticos de cortisol mediante RIA (apartado 2.5.6.1.c).

b) Administración ICV de melatonina.

Dos grupos de carpines ($17,8 \pm 0,2$ g, $n=14/\text{grupo}$, 7 peces/acuario) se inyectaron ICV con $1 \mu\text{l}$ de solución salina de teleósteos sola o conteniendo MEL a una dosis de $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, durante 4 días. El registro de la actividad locomotora, la extracción de sangre y el análisis de cortisol se realizaron del mismo modo que en el experimento anterior (administración IP).

II.2.2. RESULTADOS.

En la Figura 2.1 se representan los actogramas y periodogramas de los registros de actividad obtenidos en carpines inyectados IP con solución salina o MEL (10 µg/g) durante 7 días. Como se observa en los actogramas (Figura 2.1a), los carpines de ambos grupos experimentales, mantenidos en un fotoperiodo 12L:12D y alimentados a las 11:00 h, presentan un patrón de actividad claramente diurno, con valores muy superiores durante la fase luminosa del fotociclo (7:00-19:00 h) respecto a la mostrada durante la escotofase (19:00-7:00 h). El periodo circadiano (τ) de este ritmo de actividad locomotora en los carpines controles ($\tau = 24,2$ h) es muy similar al de los carpines inyectados con MEL ($\tau = 25,4$ h), si bien la robustez del ritmo diario es notablemente menor tras 7 días de tratamiento con la hormona (Figura 2.1b).

El tratamiento IP con MEL reduce la actividad locomotora en el carpín. El perfil temporal de este efecto a lo largo del estudio se ha representado en la Figura 2.2, en forma de porcentaje respecto de la actividad registrada en los peces del grupo control. Desde el primer día de tratamiento con MEL se observa una reducción de la actividad, que va acentuándose de forma progresiva hasta el 5º día, en que se alcanza la máxima inhibición (75% respecto al grupo control). En los días sucesivos se produce una leve recuperación hasta alcanzar valores próximos al 50% en relación con la actividad diaria total mostrada por los carpines inyectados con solución salina.

El promedio de la actividad locomotora diaria durante todos los días del tratamiento, así como la actividad registrada durante la fotofase (7:00-19:00 h) y la escotofase (19:00-7:00 h) se muestran en la Figura 2.3. En los peces control se observa un aumento marcado de la actividad anticipatoria al alimento desde el encendido de las luces (7:00 h) hasta la hora de la administración diaria del alimento (11:00 h), con valores que triplican la actividad mostrada por los peces tratados con MEL (Figura 2.3a). La actividad diurna es superior a la nocturna en ambos grupos (control, $p < 0,001$; inyectados con MEL, $p < 0,01$), si bien el tratamiento con MEL reduce significativamente ambas actividades, diurna ($p < 0,001$) y nocturna ($p < 0,01$), hasta alcanzarse valores próximos al 50% respecto a los registrados en los peces control (Figura 2.3b).

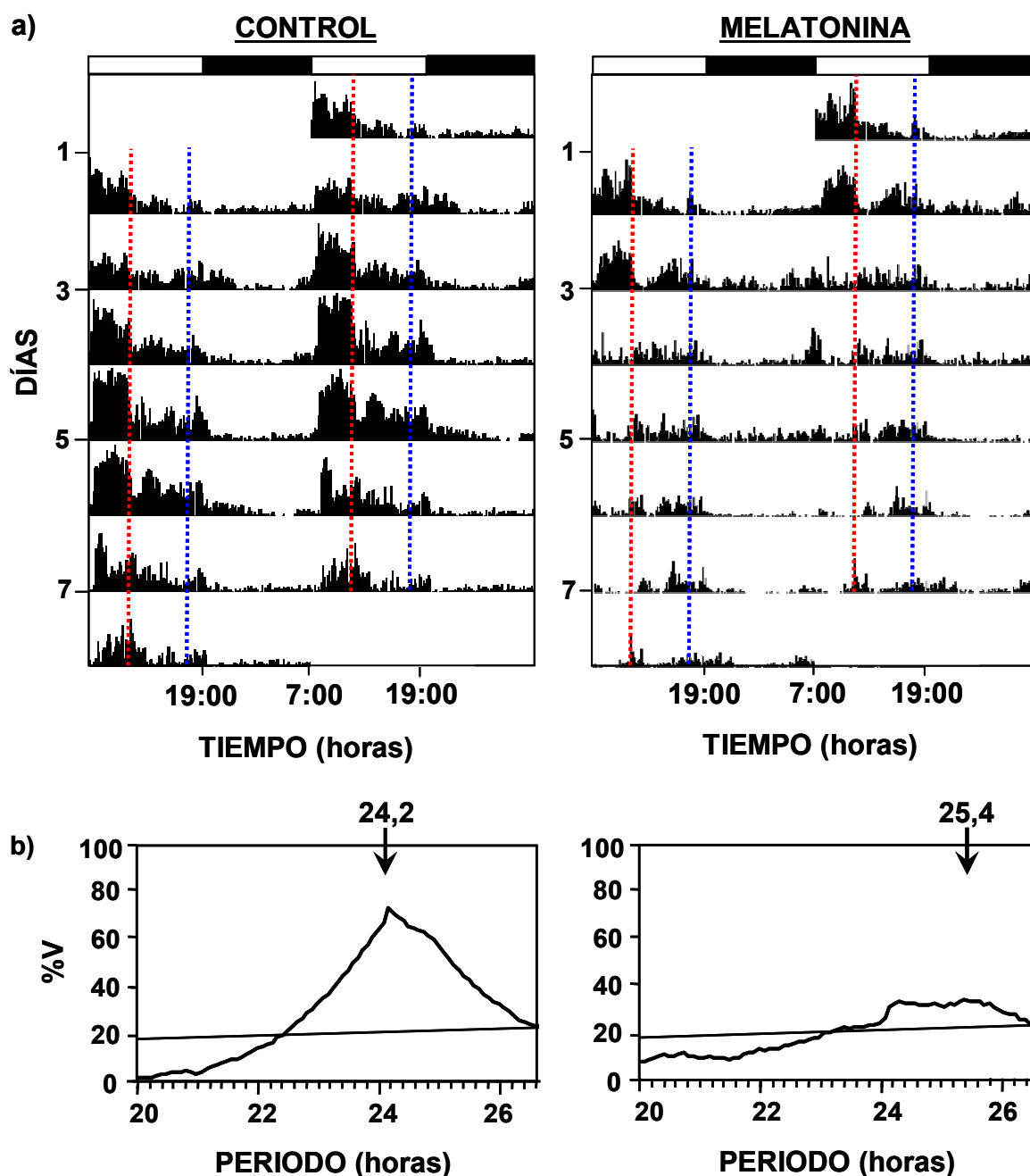


Figura 2.1. a) Actogramas de doble representación y **b)** periodogramas en carpines inyectados IP con solución salina (izquierda) o melatonina (10 $\mu\text{g/g}$, derecha) durante 7 días ($n=5/\text{acuاریo}$). Las barras horizontales blancas y negras sobre el actograma representan la fase de luz (7:00-19:00 h) y de oscuridad (19:00-7:00 h), respectivamente, del fotociclo diario. La línea vertical roja punteada indica la hora de administración del alimento (11:00 h). La línea vertical azul punteada indica el momento de la inyección (17:30-18:00 h). Las flechas en los periodogramas indican el valor de un periodo significativo ($p<0,05$).

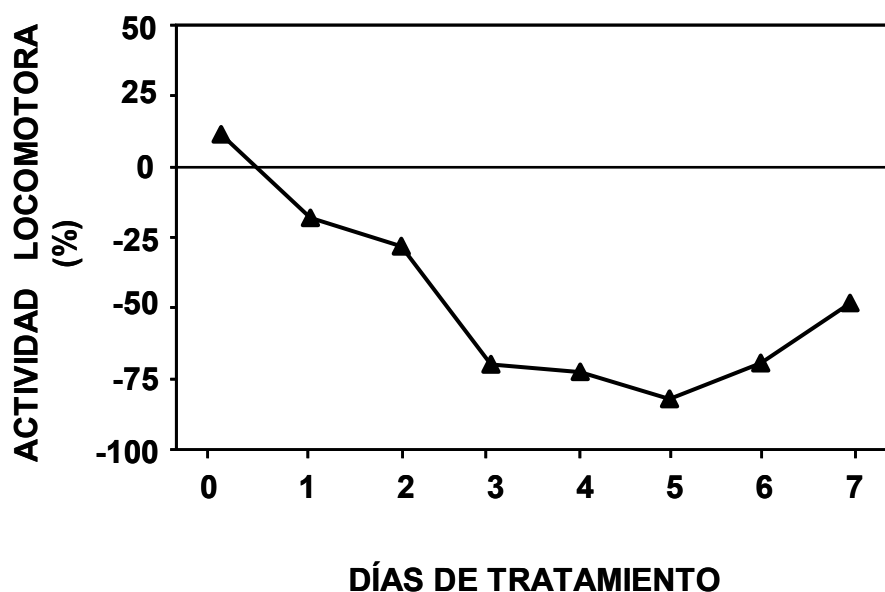


Figura 2.2. Perfil temporal de la actividad locomotora total a lo largo del tratamiento IP con melatonina (10 $\mu\text{g/g}$). Los valores se expresan como el porcentaje de actividad locomotora media de los peces tratados con melatonina respecto a la actividad locomotora media de los peces control en cada día de tratamiento ($n=10/\text{grupo}$).

En la Figura 2.4 se comparan los efectos de la MEL administrada por dos vías diferentes, IP e ICV, sobre el promedio de actividad locomotora diaria total y FAA en todos los días de tratamiento. Los peces inyectados IP con MEL (10 $\mu\text{g/g}$) durante 7 días muestran una reducción significativa ($p<0,05$) en la actividad locomotora total y en la FAA respecto a los peces control (Figura 2.4a). Sin embargo, las inyecciones ICV de MEL (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) no modificaron ni el patrón de actividad motora total ni la FAA (Figura 2.4b).

La Figura 2.5 resume los resultados obtenidos en relación a los niveles plasmáticos de cortisol tras la administración IP e ICV de MEL, pudiendo observar que la administración periférica de MEL (10 $\mu\text{g/g}$) reduce significativamente ($p<0,05$) el cortisol circulante (Figura 2.5a), pero no lo modifica cuando se administra ICV (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) durante 4 días (Figura 2.5b).

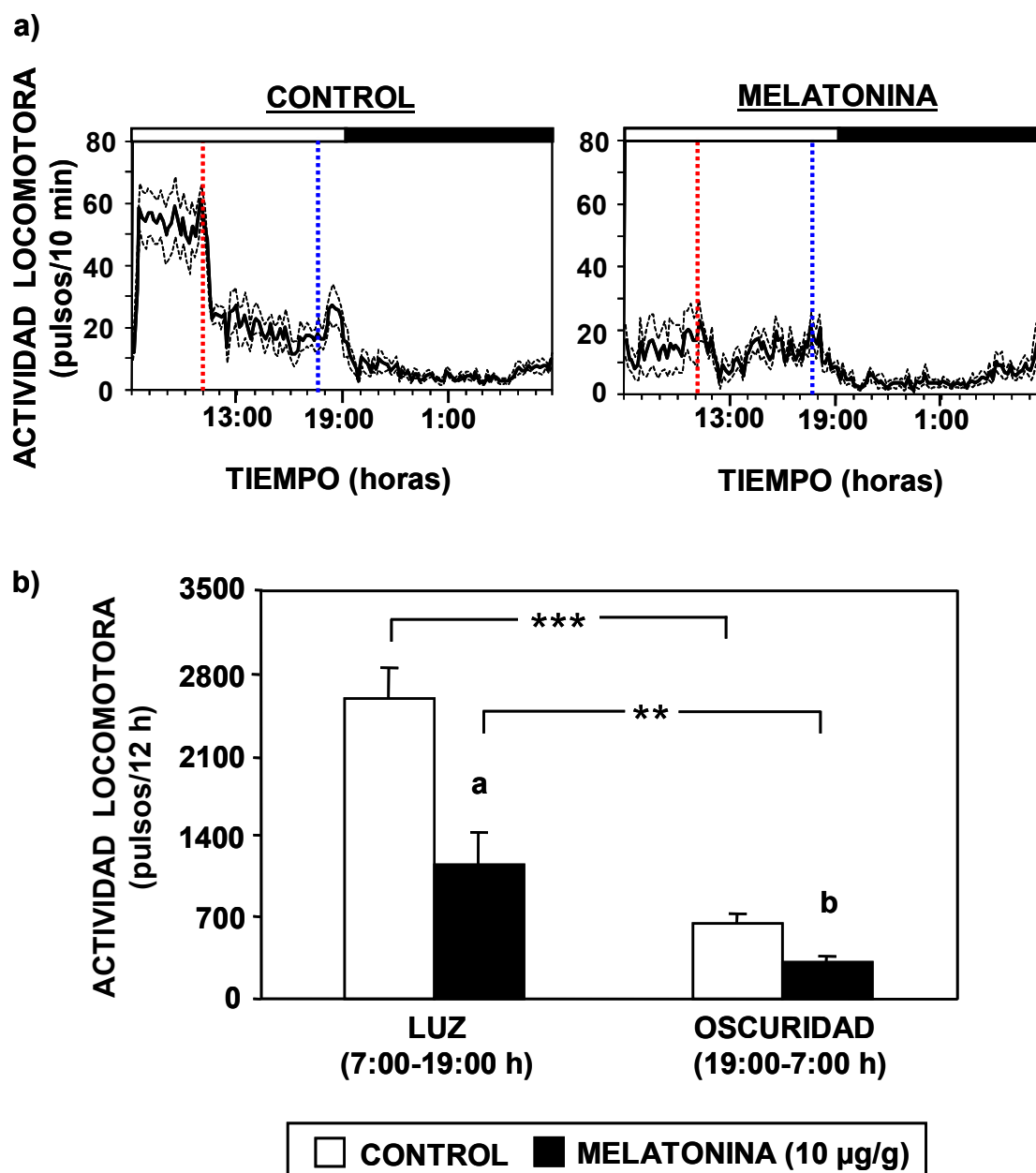


Figura 2.3. a) Promedio de actividad locomotora de los carpines inyectados IP con solución salina (izquierda) o melatonina (10 µg/g, derecha) durante 7 días. La línea sólida representa la media, y las líneas punteadas indican la media \pm e.e.m. (n=10/grupo). Las barras horizontales blancas y negras sobre las gráficas representan las fases de luz (7:00-19:00 h) y de oscuridad (19:00-7:00 h), respectivamente, del fotociclo diario. La línea vertical roja punteada indica la hora de administración del alimento (11:00 h). La línea vertical azul punteada indica el momento de la inyección (17:30-18:00 h). **b)** Efecto de la administración IP diaria de melatonina (10 µg/g) en la actividad locomotora diurna (7:00-19:00 h) y nocturna (19:00-7:00 h) en el carpín. Los datos representan la suma de la actividad registrada en cada uno de los periodos y se expresan como la media \pm e.e.m. de todos los días de inyección (n=14/grupo). a: $p < 0,001$; b: $p < 0,01$ entre grupos experimentales dentro del mismo periodo (luz u oscuridad). **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$.

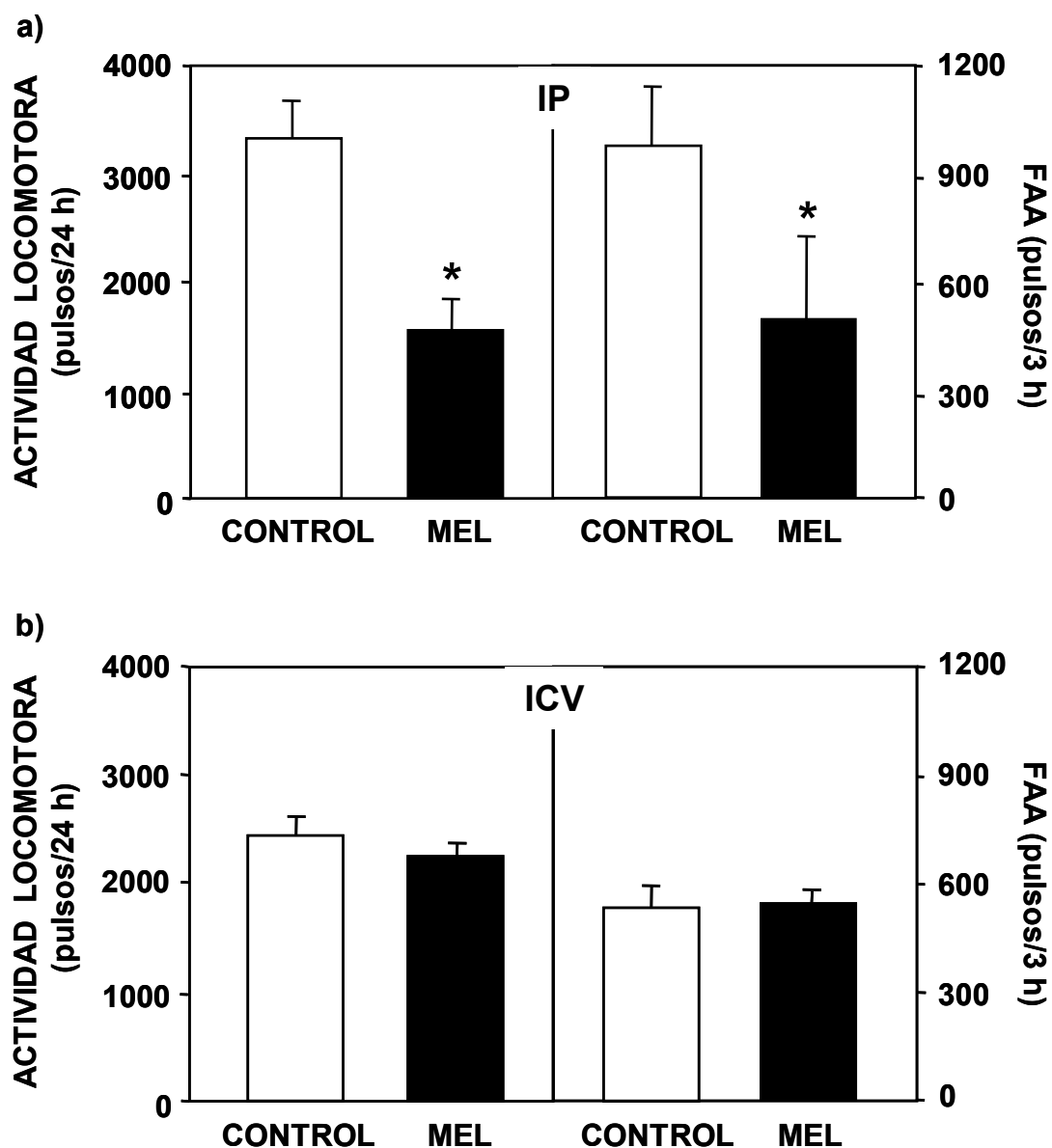


Figura 2.4. Actividad locomotora total (eje izquierdo) y actividad anticipatoria al alimento (FAA, eje derecho) de los carpines inyectados con melatonina (MEL) **a)** IP (10 $\mu\text{g/g}$) durante 7 días ($n=14/\text{grupo}$) y **b)** ICV (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) durante 4 días ($n=8/\text{grupo}$). Los datos representan la suma de la actividad diaria registrada y se expresan como la media \pm e.e.m. de todos los días de inyección. *: $p<0,05$.

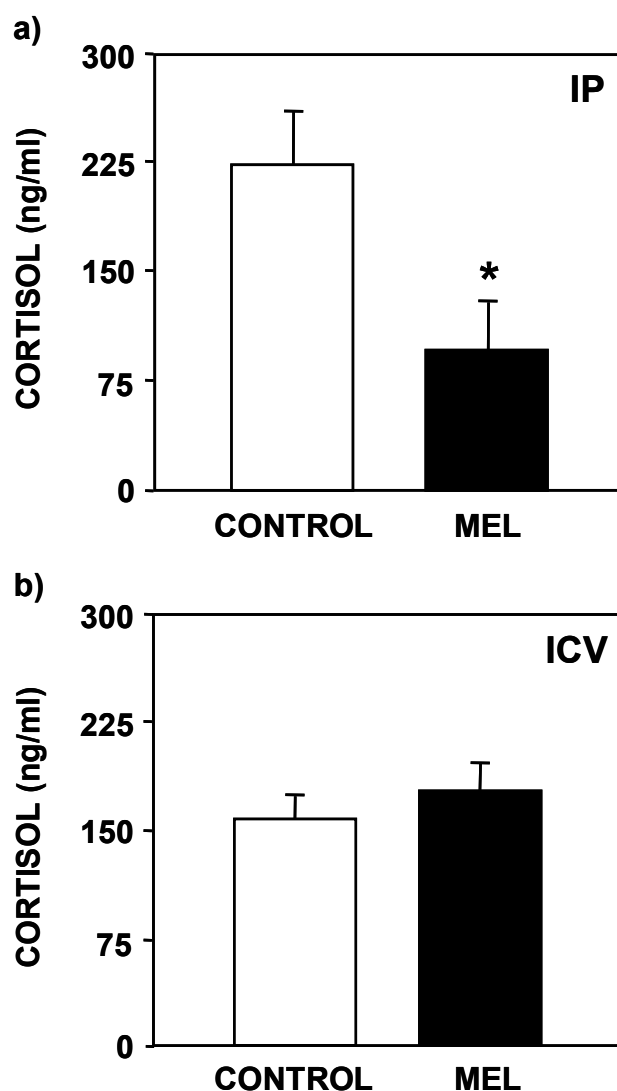


Figura 2.5. Niveles plasmáticos de cortisol en carpines inyectados con melatonina (MEL) **a)** IP (10 µg/g) durante 7 días (n=10/grupo), **b)** ICV (1 µg/µl) durante 4 días (n=14/grupo). Los datos se expresan como la media \pm e.e.m. en el último día de inyección. *: $p < 0,05$.

II.3. EFECTO DE LA RESTRICCIÓN DE ALIMENTO SOBRE LA ACTIVIDAD LOCOMOTORA Y LOS NIVELES PLASMÁTICOS DE CORTISOL.

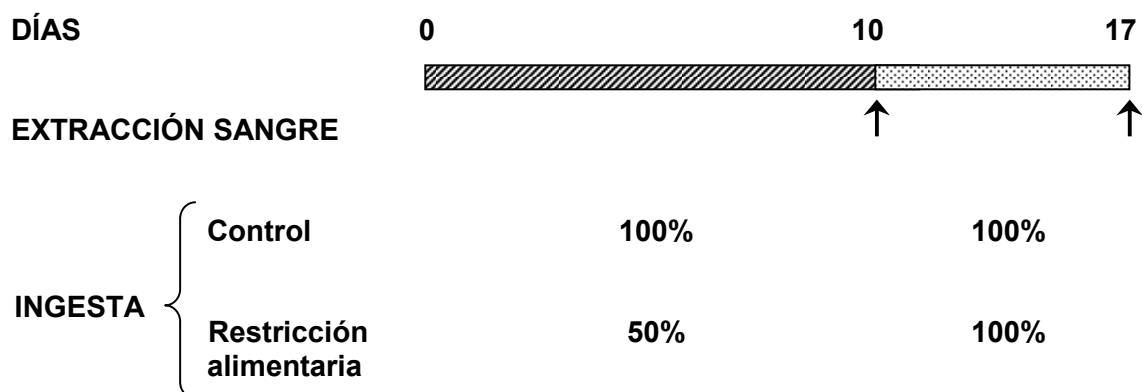
II.3.1. DISEÑO EXPERIMENTAL.

Habiendo observado que la MEL administrada IP disminuye la actividad locomotora en el carpín (diseño experimental 2.1), el objetivo de este estudio fue investigar si este efecto de la hormona es dependiente de su acción anorexigénica, previamente descrita en este teleosteo (Pinillos *et al.*, 2001).

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para la realización de este experimento se utilizaron 24 peces ($26,64 \pm 2,84$ g) divididos en dos grupos experimentales ($n=12/\text{grupo}$, 6 peces/acuario):

- Control (ingesta 100%): carpines alimentados diariamente con el 1% pc (ingesta 100%) durante 17 días.
- Restricción alimentaria (ingesta 50%): carpines alimentados diariamente con el 0,5% pc (ingesta 50%) durante 10 días. Esta disminución de la cantidad diaria de alimento suministrado es equivalente a la reducción de la ingesta observada tras la administración IP aguda de MEL (Pinillos *et al.*, 2001). Tras este periodo de restricción de alimento se procedió a la realimentación de los peces administrándoles una ración diaria del 1% pc (ingesta 100%) durante 7 días (Esquema 2.1).



Esquema 2.1. Diseño experimental para el estudio del efecto de la restricción de alimento sobre la actividad locomotora y los niveles plasmáticos de cortisol en el carpín. La barra horizontal rayada indica la fase de restricción alimentaria y la barra punteada representa la fase de realimentación.

La actividad locomotora se registró de forma ininterrumpida a lo largo de los 17 días de experimentación. Además, se extrajeron muestras de sangre los días 10 (finalizada la fase de restricción de alimento) y 17 (finalizada la fase de realimentación), que se utilizaron para la valoración de la concentración plasmática de cortisol mediante RIA (apartado 2.5.6.1.c de la sección de Materiales y métodos).

II.3.2. RESULTADOS.

La reducción de la ración diaria de alimento al 50% (0,5% pc) durante 10 días no modifica significativamente la actividad locomotora en el carpín (Figura 2.6a), observándose valores similares a los registrados en los peces del grupo control alimentados al 1% pc. Respecto a los niveles plasmáticos de cortisol, se observó una tendencia a un aumento de sus niveles circulantes en los animales con restricción alimentaria al 0,5% pc respecto a los alimentados al 1% pc, si bien esa diferencia no

llegó a ser estadísticamente significativa (Figura 2.6b). Este ligero incremento en el cortisol circulante inducido por la restricción alimentaria es totalmente revertido con la realimentación al 1% pc durante 7 días.

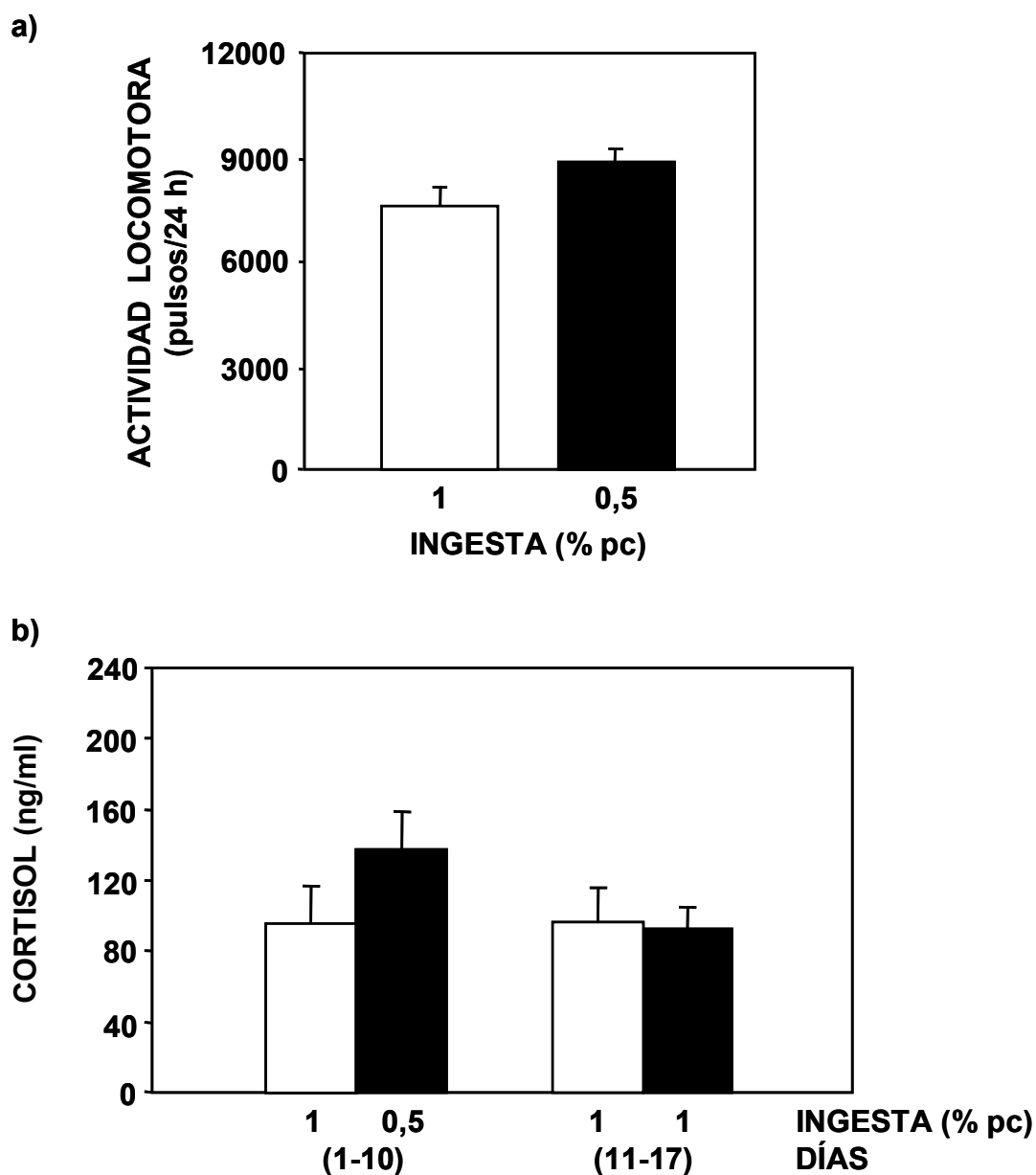


Figura 2.6. a) Actividad locomotora total en carpines alimentados con el 0,5% pc respecto a los controles (alimentados con el 1% pc) tras 10 días de tratamiento. b) Niveles plasmáticos de cortisol en carpines alimentados diariamente con el 0,5% pc durante 10 días, y realimentados con su ración diaria normal (1% pc) durante los siguientes 7 días. Los datos se expresan como la media \pm e.e.m. (n=12/grupo).

II.4. EFECTO DE LA MELATONINA SOBRE LAS RESPUESTAS PRIMARIA Y SECUNDARIA A LA EXPOSICIÓN A UN PROTOCOLO DE ESTRÉS AGUDO.

II.4.1. DISEÑOS EXPERIMENTALES.

Con este diseño se pretendió conocer si la MEL puede modular algunas de las respuestas producidas tras la exposición a un estrés agudo en el carpín. En este estudio utilizamos como modelo de estrés agudo la exposición al aire durante 1 min, situación a la que los peces pueden enfrentarse de forma más o menos habitual durante su manejo.

Debido a que el carpín es una especie gregaria (Rodríguez-Solís *et al.*, 2005), y con el fin de estudiar si el aislamiento social modifica el posible efecto de la MEL sobre las respuestas al estrés, este diseño se realizó en dos condiciones diferentes: en peces aislados en acuarios individuales de 5 l de capacidad y en grupos de 6 carpines mantenidos en acuarios de 60 l.

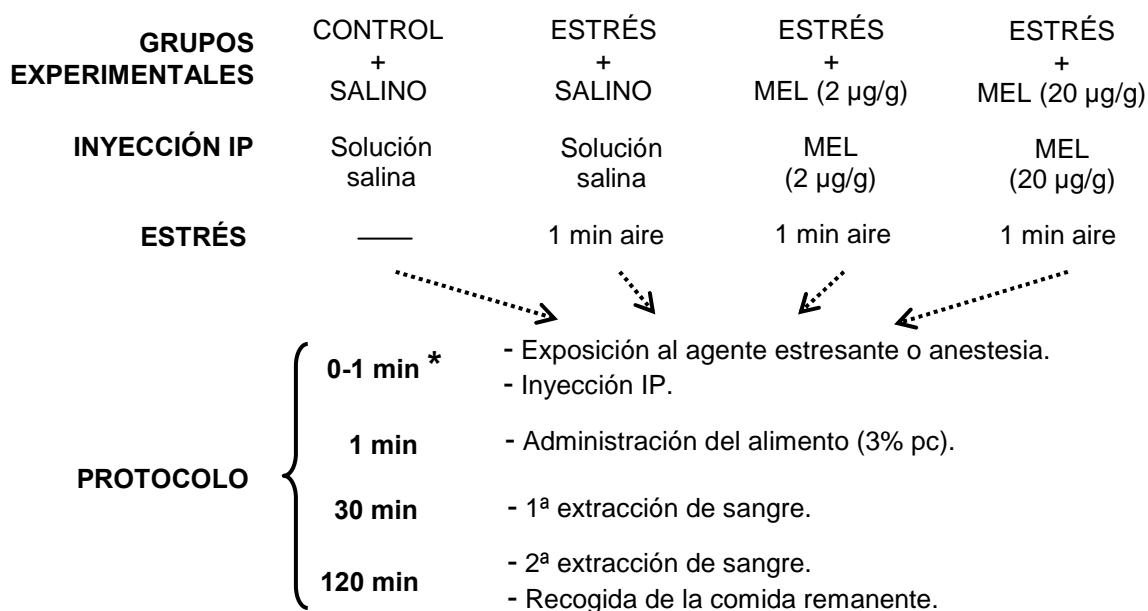
a) Peces aislados.

Los carpines ($31,88 \pm 1,11$ g, $n=8/\text{grupo}$) se distribuyeron en peceras individuales de 5 l desde las 24 horas previas al inicio del experimento, estableciendo los siguientes grupos experimentales:

- Control + salino: carpines anestesiados con MS-222 e inyectados IP con solución salina (10 $\mu\text{l/g pc}$).
- Estrés + salino: carpines sometidos a un estrés agudo (exposición al aire durante 1 min) e inyectados IP con solución salina (10 $\mu\text{l/g pc}$).
- Estrés + MEL (2 $\mu\text{g/g pc}$): carpines sometidos a un estrés agudo (1 min al aire) e inyectados IP con MEL (2 $\mu\text{g/g pc}$).
- Estrés + MEL (20 $\mu\text{g/g pc}$): carpines sometidos a un estrés agudo (1 min al aire) e inyectados IP con MEL (20 $\mu\text{g/g pc}$).

Los carpines fueron sometidos individualmente al protocolo de estrés, durante el cual se inyectaron con solución salina o MEL a las concentraciones indicadas. Transcurrido el minuto de inducción de estrés los peces fueron devueltos a los acuarios de 5 l y recibieron el alimento (3% pc). La actividad locomotora se registró de forma ininterrumpida durante dos ciclos completos de 24 horas, uno anterior y otro posterior a las inyecciones. Se valoró la cantidad de alimento ingerido en los 120 min posteriores al tratamiento y se extrajeron muestras de sangre a los 30 y 120 min de las inyecciones, para cuantificar los niveles plasmáticos de cortisol y glucosa (apartados 2.5.6.1.c y 2.5.3., respectivamente, de la sección de Materiales y métodos).

El diseño experimental aparece resumido en el Esquema 2.2:



* Los peces control, anestesiados, estuvieron fuera del agua el tiempo mínimo necesario para realizar la inyección IP (10-12 seg).

Esquema 2.2. Grupos experimentales y protocolo utilizado para el estudio de los efectos de la MEL en las respuestas a un modelo de estrés agudo en el carpín.

b) Peces en grupo.

Se realizó un experimento similar al anterior, pero manteniendo a los peces (26,81 ± 0,79 g) agrupados en acuarios de 60 l durante todo el experimento (n=6/acuario). En este estudio inyectamos únicamente la dosis de MEL de 20 µg/g pc, en base a los resultados obtenidos en el experimento anterior con peces aislados. Los grupos experimentales fueron:

- Control + salino: carpines anestesiados con MS-222 e inyectados IP con solución salina (10 µl/g pc).
- Estrés + salino: carpines sometidos a un estrés agudo (exposición al aire durante 1 min) e inyectados IP con solución salina (10 µl/g pc).
- Estrés + MEL (20 µg/g pc): carpines sometidos a un estrés agudo (1 min al aire) e inyectados IP con MEL (20 µg/g pc).

El protocolo de estrés e inyecciones fue similar al descrito en el experimento anterior. La actividad locomotora se registró durante dos ciclos completos de 24 horas, anterior y posterior al momento de las inyecciones.

II.4.2. RESULTADOS.

a) Peces aislados.

La exposición de los carpines al aire durante 1 min incrementa el cortisol circulante respecto a los peces control, aunque este aumento sólo resulta ser estadísticamente significativo ($p < 0,05$) a los 30 min (Figura 2.7a). La inyección IP de MEL no modifica los niveles de cortisol en plasma a los 30 min, si bien a los 120 min de la inyección, la hormona revierte el aumento de cortisol inducido por la exposición al estrés, siendo dicho descenso muy notable con la dosis de 20 $\mu\text{g/g}$ ($p < 0,01$), hasta alcanzar valores incluso inferiores a los encontrados en el grupo control (Figura 2.7b).

La glucemia no se modifica de forma significativa en ninguno de los cuatro grupos experimentales a los 30 min del tratamiento (Figura 2.8a). A los 120 min se observa una tendencia al incremento de los niveles circulantes de glucosa, más marcada en los grupos de carpines inyectados con MEL, si bien estas diferencias no resultan ser estadísticamente significativas respecto al grupo control (Figura 2.8b).

La ingestión de alimento en los carpines sometidos a un protocolo de estrés agudo e inyectados IP con MEL se representa en la Figura 2.9. El modelo de estrés agudo aplicado (exposición al aire durante 1 min) reduce significativamente ($p < 0,05$) la cantidad de alimento ingerida por los carpines durante los 120 min posteriores a la exposición al estrés. Esta inhibición de la ingesta se revierte con la inyección IP aguda de MEL a las dos dosis empleadas, obteniendo una reversión total y significativa ($p < 0,05$) con la dosis más baja (2 $\mu\text{g/g}$), y únicamente parcial a la dosis más alta empleada en este estudio (20 $\mu\text{g/g}$).

Los posibles cambios en la actividad locomotora fueron evaluados a dos tiempos: a las 2,5 h y a las 24 h posteriores a la exposición al estrés y al tratamiento hormonal. Los resultados muestran (Figura 2.10) que el estrés agudo aplicado no altera de forma significativa la actividad motora a ninguno de los dos tiempos estudiados. La actividad a corto plazo (0-2,5 h) resulta ser significativamente inferior en los peces estresados e inyectados con MEL (2 y 20 $\mu\text{g/g}$), respecto a los peces inyectados con solución salina, tanto intactos (controles) como sometidos a estrés agudo (Figura 2.10a). Este efecto de reducción de la actividad producido por la MEL se mantiene transcurridas 24 h del tratamiento agudo con la dosis de 20 $\mu\text{g/g}$ (Figura 2.10b).

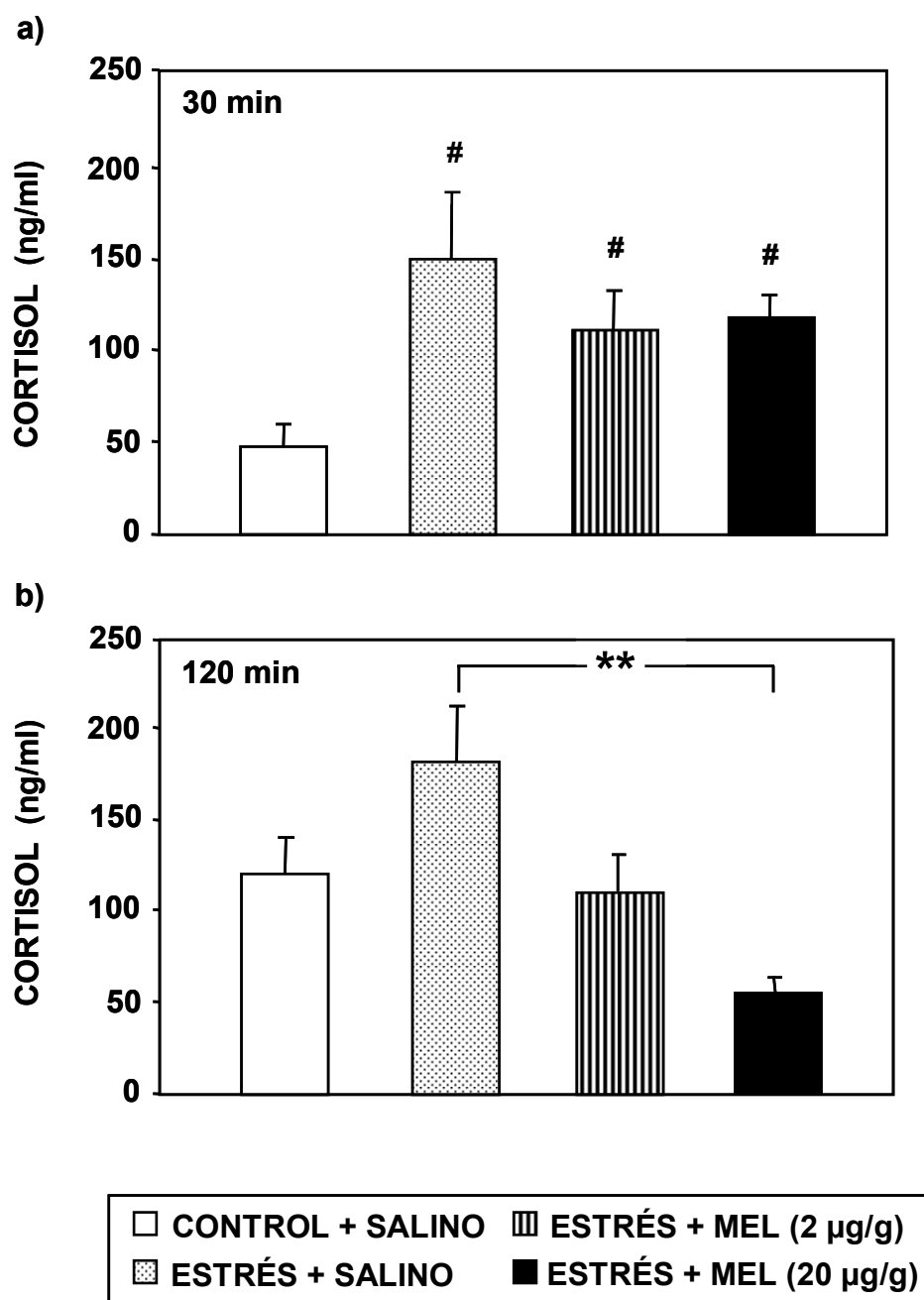


Figura 2.7. Niveles plasmáticos de cortisol a los **a)** 30 min y **b)** 120 min de la administración aguda IP de melatonina (MEL, 2 y 20 µg/g) en carpines sometidos a un modelo de estrés agudo (exposición al aire durante 1 min). Los datos se expresan como la media \pm e.e.m. (n=8/grupo). #: $p < 0,05$, respecto al grupo control; **: $p < 0,01$.

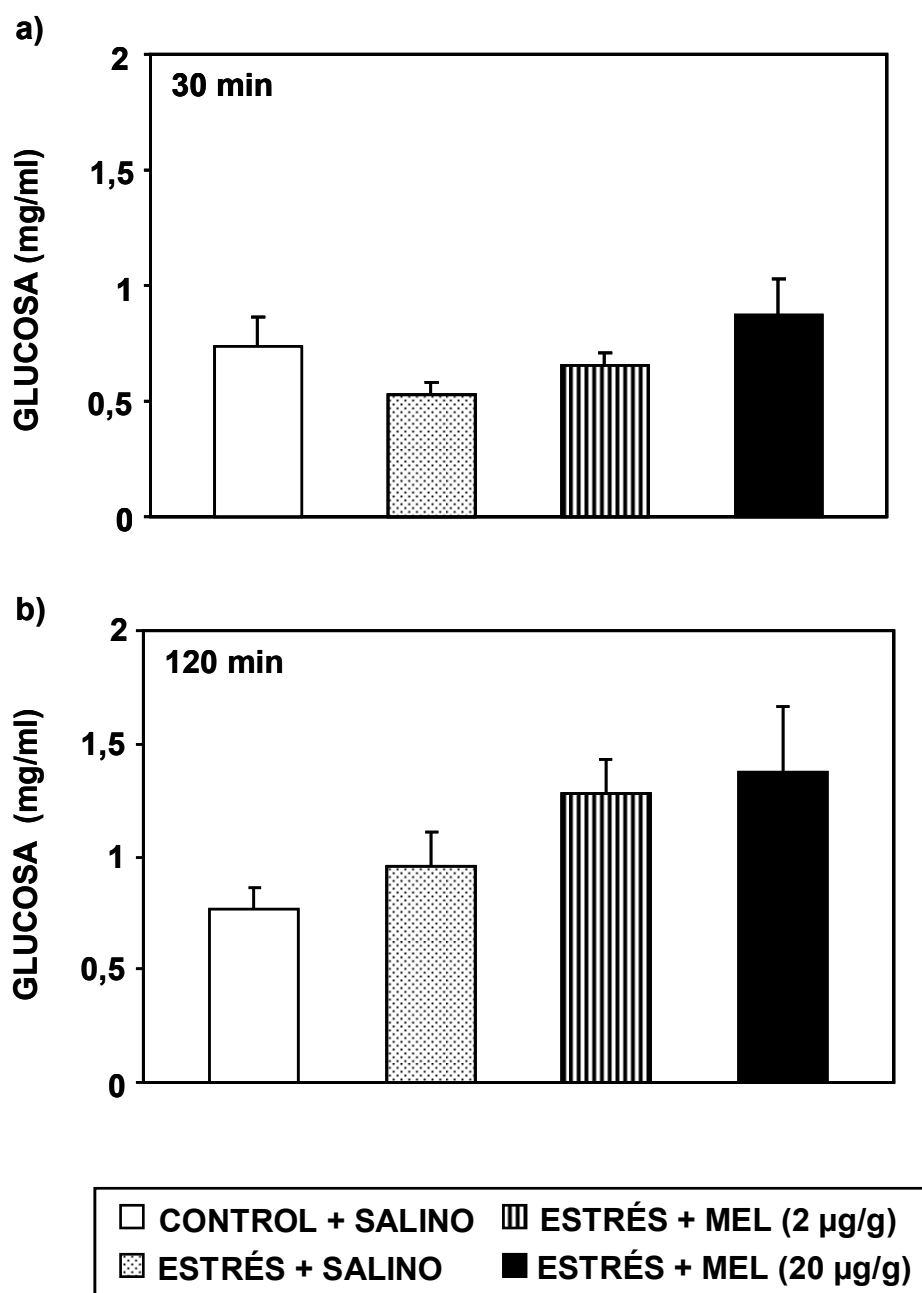


Figura 2.8. Glucemia a los **a)** 30 min y **b)** 120 min de la administración aguda IP de melatonina (MEL, 2 y 20 µg/g) en carpines sometidos a un modelo de estrés agudo (exposición al aire durante 1 min). Los datos se expresan como la media ± e.e.m. (n=8/grupo).

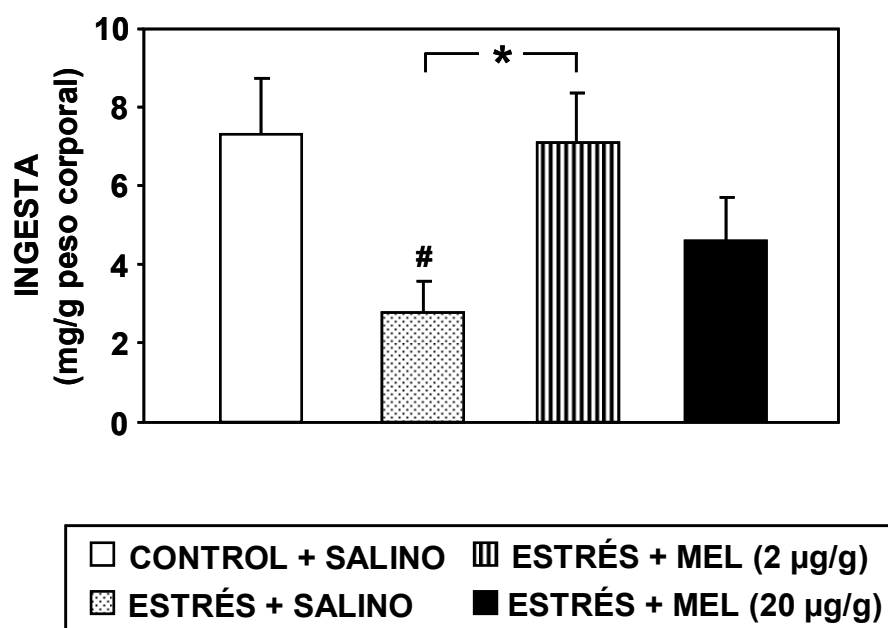


Figura 2.9. Ingesta a los 120 min de la administración aguda IP de melatonina (MEL, 2 y 20 µg/g) en carpines sometidos a un modelo de estrés agudo (exposición al aire durante 1 min). Los datos se expresan como la media ± e.e.m. (n=8/grupo). #: $p < 0,05$, respecto al grupo control; *: $p < 0,05$.

b) Peces en grupo.

Con el fin de evitar una posible interacción de nuestro diseño experimental con el efecto del aislamiento de los peces sobre parámetros de actividad motora, se realizó el mismo estudio pero en peces agrupados en acuarios de 60 l. En la Figura 2.11 se muestran los perfiles de actividad locomotora correspondientes a las 24 horas anteriores y posteriores al protocolo de estrés y administración IP de MEL. Los patrones de actividad en las 24 horas previas al tratamiento son muy similares en los tres grupos de peces, registrándose una mayor actividad durante la fotofase que durante la escotofase. La exposición al estrés produce una alteración marcada en el patrón diario de actividad, con una reducción inicial en las primeras 4 h post-inyección, acompañada de un aumento notable durante la fase nocturna y el inicio de la siguiente fase diurna. La administración IP de MEL (20 µg/g) durante la exposición al estrés reduce de forma general la actividad locomotora, observándose dicho efecto desde aproximadamente 4 h después de la inyección hasta, al menos, las 24 h siguientes.

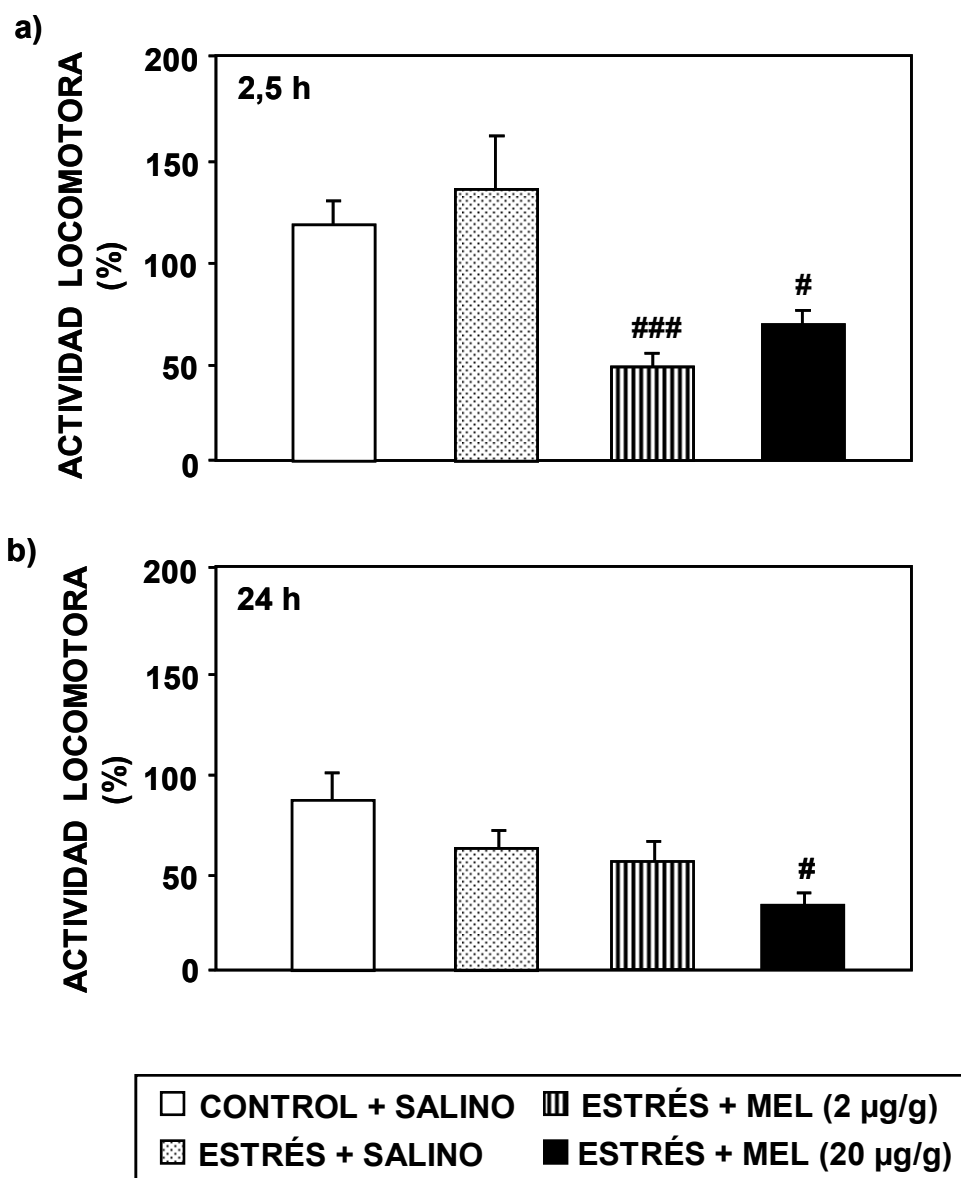


Figura 2.10. Actividad locomotora a las **a)** 2,5 h y **b)** 24 h de la administración aguda IP de melatonina (MEL, 2 y 20 µg/g) en carpines sometidos a un modelo de estrés agudo (exposición al aire durante 1 min). Los valores de actividad en cada grupo experimental representan el porcentaje respecto a la actividad locomotora de cada pez en la misma franja horaria del día previo al tratamiento. Los datos se expresan como la media \pm e.e.m. (n=8/grupo). #: $p < 0,05$; ###: $p < 0,001$, respecto al grupo control.

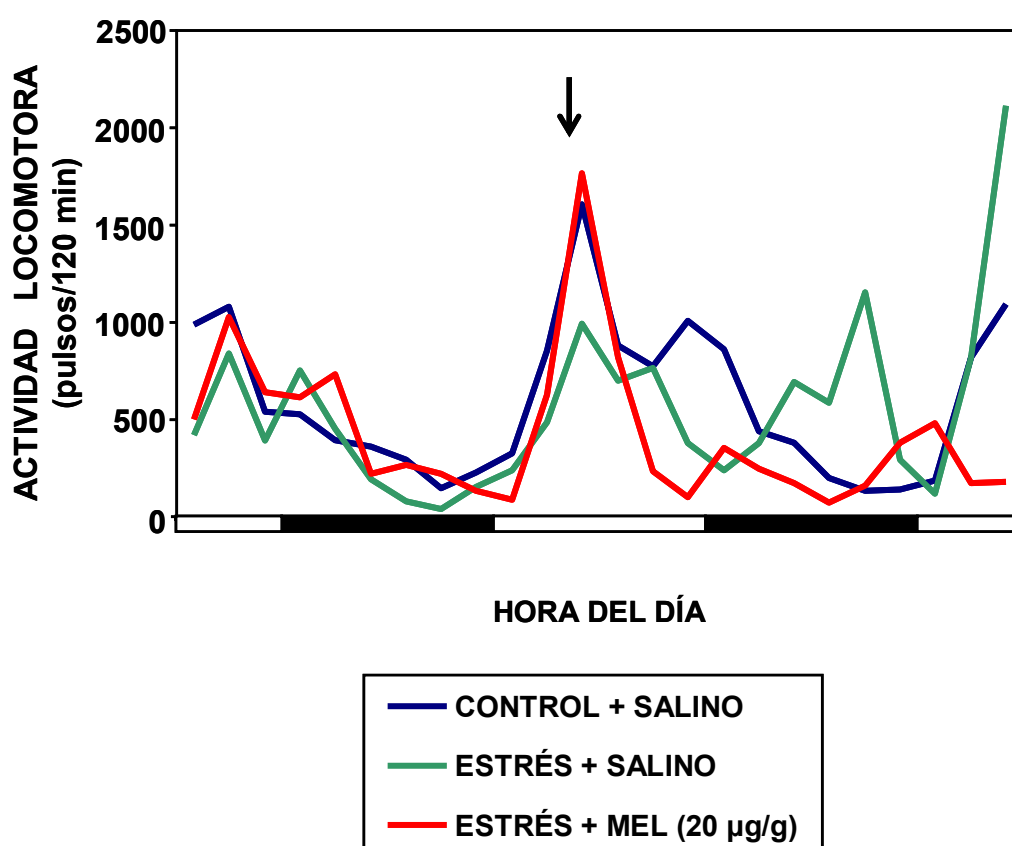


Figura 2.11. Perfil temporal de actividad locomotora de los carpines mantenidos en grupo y sometidos a un protocolo de estrés agudo (exposición al aire durante 1 min) e inyección IP con melatonina (MEL, 20 µg/g). La actividad se registró durante las 24 h anteriores y posteriores al tratamiento (n=6/acuario). Las barras horizontales blancas y negras en el eje de abscisas indican las fases de luz (7:00-19:00 h) y de oscuridad (19:00-7:00 h), respectivamente, del fotociclo diario. La flecha indica el momento de la inyección y de la exposición al estrés.

La Figura 2.12a resume los resultados obtenidos de los valores de actividad locomotora diurna y nocturna mostrada por los carpines de los tres grupos experimentales durante las 24 h posteriores a la inyección. Los peces del grupo control continúan presentando un patrón de actividad claramente diurno, con valores notablemente superiores en las fases diurnas respecto al periodo de noche. La exposición al aire durante 1 min incrementa la actividad motora nocturna (19:00-7:00 h) y diurna (7:00-11:00 h) del día siguiente respecto a los peces no estresados, y el tratamiento con MEL (20 µg/g) revierte muy significativamente este efecto. En los registros de la FAA (periodo 7:00-11:00 h del día siguiente a la exposición al estrés y tratamiento con MEL) observamos que mientras que esta conducta alimentaria no se modifica en los controles, el modelo de estrés agudo aplicado duplica sus valores (Figura 2.12b). Este efecto es revertido totalmente por el tratamiento con MEL, que

reduce muy significativamente la FAA hasta alcanzar cifras aproximadamente 5 veces inferiores a las encontradas en el grupo control.

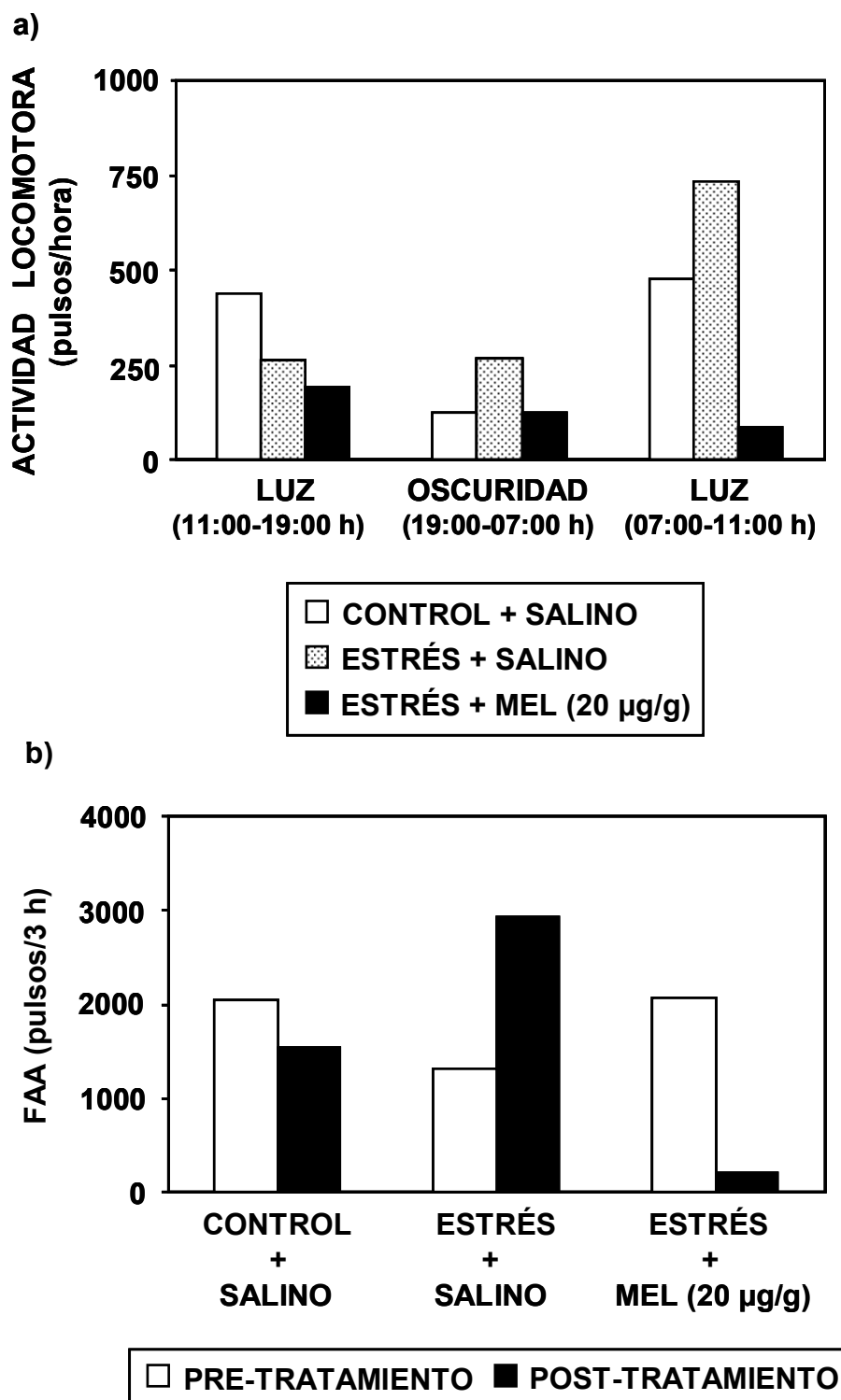


Figura 2.12. Efecto de la administración IP de melatonina (MEL, 20 µg/g) sobre **a)** la actividad locomotora diurna y nocturna y **b)** la FAA durante las horas posteriores al tratamiento en carpines agrupados (n=6/acuario) y sometidos a un estrés agudo (exposición al aire durante 1 min).

II.5. EFECTO DE LA MELATONINA EN LA EXPRESIÓN DE GENES FUNCIONALES DEL EJE HIPOTÁLAMO-HIPÓFISIS-INTERRENAL EN UN MODELO DE ESTRÉS AGUDO.

II.5.1. DISEÑO EXPERIMENTAL.

Los carpines ($14,24 \pm 0,3$ g) aclimatados durante 2 semanas a condiciones de fotoperiodo 12L:12D (encendido de las luces a las 8:00 h) y alimentación diaria a las 10:00 h se dividieron en 3 grupos experimentales ($n=16/\text{grupo}$, 8 peces/acuario):

- Control + salino: carpines inyectados IP con solución salina ($10 \mu\text{l/g pc}$) durante 4 días y no expuestos a estrés.
- Estrés + salino: carpines inyectados IP con solución salina ($10 \mu\text{l/g pc}$) durante 4 días. El cuarto día los peces fueron sometidos a un protocolo de estrés agudo inmediatamente después de la inyección.
- Estrés + MEL ($20 \mu\text{g/g pc}$): carpines inyectados IP con MEL ($20 \mu\text{g/g pc}$) durante 4 días. El cuarto día los peces fueron sometidos a un protocolo de estrés agudo inmediatamente después de la inyección.

La administración IP diaria de solución salina o MEL se realizó 3 horas antes del inicio de la fase oscura (17:00-17:30 h) en peces previamente anestesiados (MS-222). El último día del tratamiento, el grupo control se inyectó bajo anestesia, pero los dos grupos restantes fueron sometidos a un protocolo de estrés consistente en 5 min de manipulación (incluyendo la inyección IP sin anestesia previa). El último día del tratamiento se sacrificó a los peces a los 30 y 120 min de la última inyección ($n=8$ peces/grupo/hora de muestreo) y se procedió a la inmediata extracción del hipotálamo, la hipófisis y el riñón para analizar la expresión de los siguientes genes:

- *precursor de crf* en el hipotálamo.
- receptor de CRF tipo 1 (*crf-r1*) y proopiomelanocortina (*pomc*) en la hipófisis.
- receptor de melanocortinas tipo 2 (*mc2r*) y proteína aguda reguladora de la esteroidogénesis (*star*) en el riñón.

Algunos de los análisis de este bloque fueron realizados en el laboratorio dirigido por el Dr. Pål Olsvik en el Instituto NIFES (Bergen, Noruega), gracias al programa de estancias breves de las becas FPU financiado por el MEC.

Los números de acceso de los genes analizados, las secuencias de los cebadores utilizados y el tamaño de los amplicones obtenidos se muestran en la Tabla 2.1.

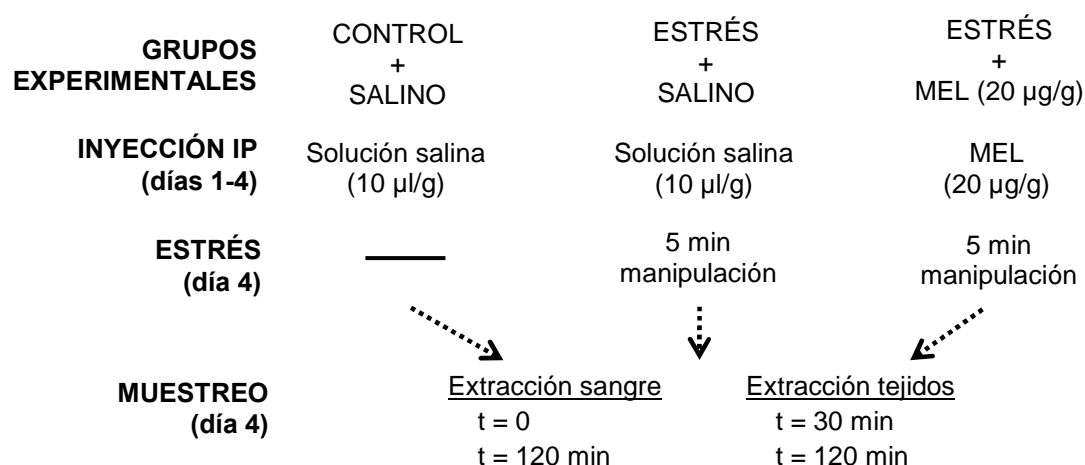
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 2.1. Números de acceso, secuencia de cebadores y tamaño de los amplicones de genes funcionales del eje HPI y del gen de referencia (β -actina) cuya expresión se analizó mediante qRT-PCR en el hipotálamo, la hipófisis y el riñón del carpín.

Gen		Secuencia (5'→3')	Tamaño amplicón (pb)	Número acceso (Genbank)
<i>precursor de crf</i>	Forward	5'-GGCTCTGCTCGTTGCCTTT-3'	121	AF098629
	Reverse	5'-CCCTAAGCGTGCCAAAACC-3'		
<i>crf-r1</i>	Forward	5'-TCTCTCTGGGAGCCCTGTTG-3'	121	AY688836
	Reverse	5'-AGGTGGCATTTCGCAGGAT-3'		
<i>pomc</i>	Forward	5'-CTCACCCTGACGAGAACATCTTG-3'	121	AJ431209
	Reverse	5'-CGGTTTGCTCCAGCTCAGA-3'		
<i>mc2r</i>	Forward	5'-TGCCAACAGGATCGCATCTA-3'	101	FJ554533
	Reverse	5'-CCACAAACACCCCAATCAAGA-3'		
<i>star</i>	Forward	5'-ATGAGTAAAGTTCTACCAGGCATTGG-3'	121	AY877430
	Reverse	5'-GGTTCCACTCCCCCATTTGT-3'		
β -actina	Forward	5'-GGCCTCCCTGTCTATCTTCC-3'	156	AB039726
	Reverse	5'-TTGAGAGGTTTGGGTTGGTC-3'		

Antes de la última inyección (t=0) y a los 120 min se extrajo una muestra de sangre en peces anestesiados para cuantificar los niveles plasmáticos de cortisol, glucosa y lactato (apartados 2.5.6.2., 2.5.3. y 2.5.4., respectivamente, de la sección de Materiales y métodos).

El diseño experimental realizado se resume en el siguiente esquema:



Esquema 2.3. Diseño experimental para el estudio del efecto del tratamiento con MEL en la expresión de genes implicados en la activación del eje HPI tras la exposición a un estrés agudo en el carpín.

II.5.2. RESULTADOS.

La Figura 2.13 muestra los efectos de la exposición a un estrés agudo por manipulación (5 min) y del tratamiento con MEL (20 µg/g) en los niveles plasmáticos de cortisol, glucosa y lactato a los 120 min. El protocolo de estrés utilizado incrementa significativamente los niveles circulantes de los 3 parámetros analizados (cortisol: $p < 0,01$; glucosa y lactato: $p < 0,05$) respecto a los valores medidos en los carpines del grupo control. La administración IP de MEL durante 4 días revierte totalmente el incremento de cortisol ($p < 0,001$) inducido por la exposición al estrés, alcanzándose valores inferiores a los encontrados en los carpines del grupo control. El tratamiento con MEL no modifica la glucemia en los peces estresados pero reduce el aumento del lactato plasmático inducido por la exposición al estrés, si bien este efecto no es estadísticamente significativo.

La secuencia parcial del gen que codifica para el receptor de ACTH (*mc2r*) en el carpín y la secuencia de aminoácidos deducida, han sido depositadas en *GenBank* (números de acceso: FJ554533 y ACU30047, respectivamente) y se representan en la Figura 2.14. La región secuenciada del gen contiene 460 pb que codifican para un fragmento de 130 aminoácidos.

Tras el alineamiento de la secuencia de aminoácidos del MC2R del carpín con otras secuencias de vertebrados se observa que el fragmento secuenciado contiene los dominios transmembrana (TM) 3, 4, 5, 6 y 7 del receptor (los dominios 3 y 7 solo se han secuenciado parcialmente) (Figura 2.15a). Asimismo, se ha encontrado la secuencia DRY entre el TM3 y el segundo bucle intracelular, que es común en todas las secuencias alineadas, y un residuo de serina/treonina (S/T) adyacente a él, con función estructural. Además, se observa un residuo de treonina (T) conservado en todas las secuencias comparadas, potencial candidato para la fosforilación por una PKC. Los aminoácidos en posiciones adyacentes a este residuo presentan un alto grado de conservación, y posiblemente sean necesarios para dicha fosforilación. Asimismo, se observa un posible lugar de glucosilación entre TM4 y TM5. El análisis filogenético indica que la secuencia de MC2R en carpín se engloba en el grupo de los ciprínidos, presentando la semejanza mayor con la secuencia de la carpa, seguida de la del pez cebra (Figura 2.15b).

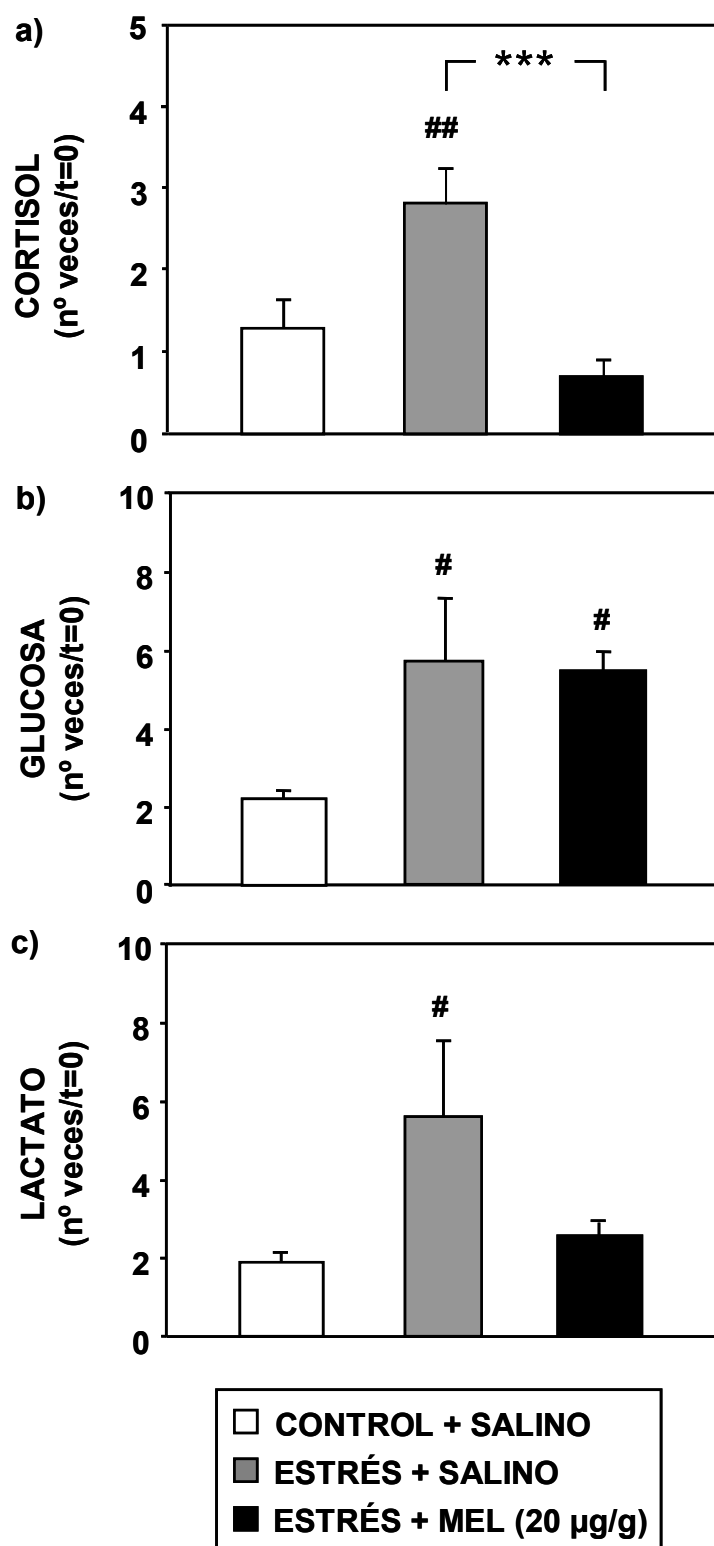


Figura 2.13. Niveles plasmáticos de **a)** cortisol, **b)** glucosa y **c)** lactato en carpines inyectados IP con solución salina o melatonina (MEL, 20 µg/g) durante 4 días y sometidos a un protocolo de estrés agudo (manipulación durante 5 min) tras la última inyección. Los datos representan el incremento en los niveles circulantes de cortisol, glucosa y lactato a los 120 min de la última inyección respecto a los niveles plasmáticos inmediatamente antes de la misma (t=0), y se expresan como la media ± e.e.m. (n=8/grupo). #: p<0,05; ##: p<0,01, respecto al grupo control; ***: p<0,001.

```

1  ttcagcatcc tcgccatagc cgtggaccgc tacatcagca tattccacgc gctacgctat

      M T M R   R V V   V T L   S T I W   V F C
61  cacacgctca tgaccatgcg tcgcgtggtg gtaacgttgt ccaccatctg ggtgttctgt

      G T S   G V L M   I G F   S N A   A T V K   I F F
121 ggcaccagcg gagtgctcat gatcgggttc tccaatgctg ctacggtgaa aatcttcttc

      V V L   F F T A   L L L   I L L   L Y V H   M F L
181 gttgtgctct tcttcacagc tctgctcctc atcctcttgc tctatgtaca tatgttctgt

      L A R   H H A N   R I A   S M P   G L H A   R Q R
241 ttagcgcgcc accatgcca caggatcgca tctatgccag gacttcacgc gcgccagaga

      Q S G   L R G A   L T L   T I L   I G V F   V A C
301 caaagtggct tgaggggggc gctgacacta accatcttga ttggggtggt tgtggcctgc

      W A P   F S L H   L L I   S M I   C P E N   P Y C
361 tgggctcctt tctctcttca tctgctgatt tcaatgattt gccagagaa cccgtactgt

      E C Y   R S L F   Q L H   V V L
421 gagtgctacc gctcactctt ccagctgcat gtagtggttac

```

Figura 2.14. Secuencia parcial de nucleótidos del gen que codifica para el receptor de melanocortinas tipo 2 (*mc2r*) en *Carassius auratus* (número de acceso en *GenBank* FJ554533). El número de nucleótido está indicado a la izquierda. La secuencia de aminoácidos deducida (número de acceso ACU30047) aparece representada sobre la secuencia de nucleótidos.

Los niveles de expresión relativa del *precursor de crf* hipotalámico se muestran en la Figura 2.16. A los 30 min de la última inyección no existen diferencias en el número de transcritos entre grupos experimentales (Figura 2.16a). En cambio, a los 120 min se observa un leve aumento en la expresión de este gen tras la exposición al estrés, aunque esta diferencia no resulta ser estadísticamente significativa (Figura 2.16b). La administración IP de MEL durante 4 días no modifica la expresión génica del *precursor de crf* ni a los 30 ni a los 120 min de la exposición al estrés.

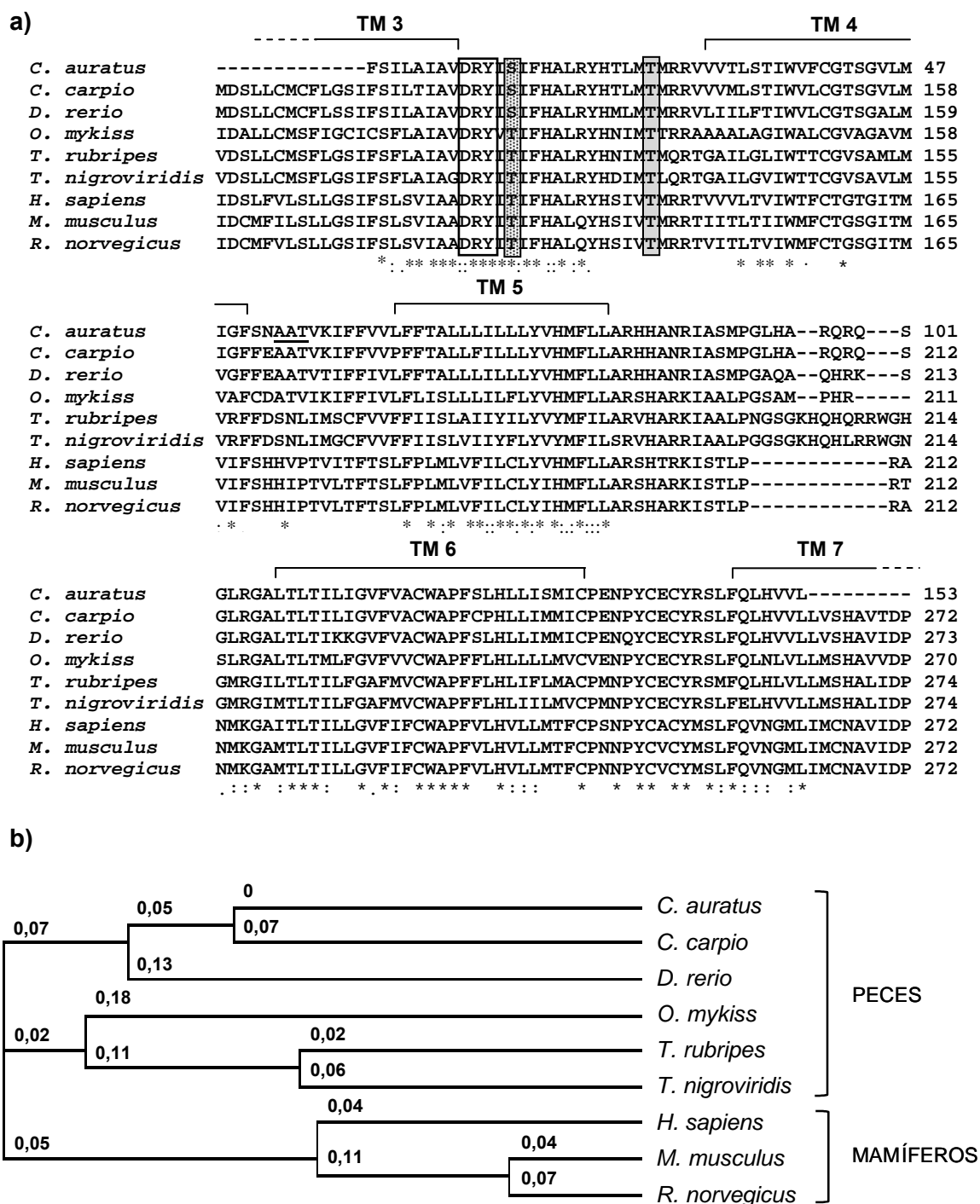


Figura 2.15. a) Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de MC2R en varias especies de vertebrados. Los guiones indican espacios introducidos para lograr el alineamiento óptimo de las secuencias. El número de los aminoácidos está indicado a la derecha. Los dominios transmembrana (TM) 3, 4, 5, 6 y 7 aparecen indicados en la secuencia. El recuadro blanco indica una secuencia DRY. Los recuadros punteado y gris indican residuos de serina/treonina que pueden ser fosforilados por PKC. Los aminoácidos subrayados indican posibles lugares de glucosilación. *, identidad total; :, sustitución conservada; ., sustitución semi-conservada. **b)** Filograma mostrando la similitud de la secuencia de aminoácidos del receptor MC2R entre especies. El número sobre cada rama indica la tasa de cambio de aminoácidos en tanto por 1.

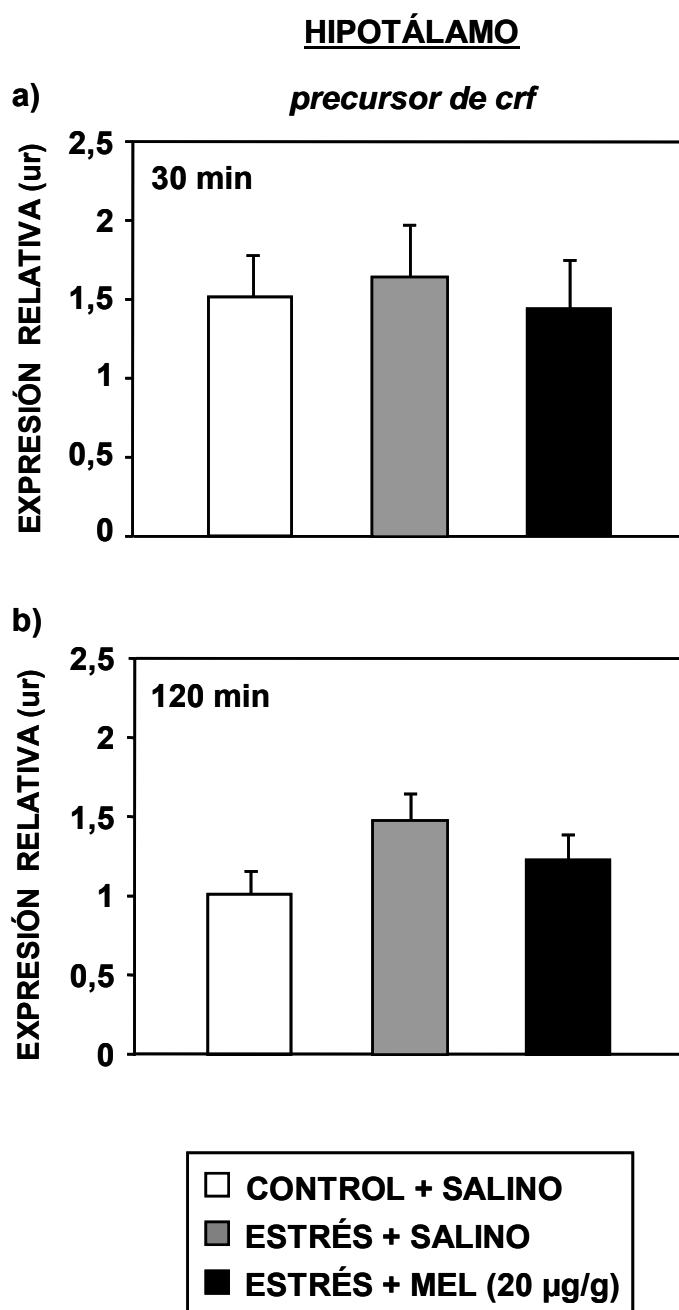


Figura 2.16. Expresión relativa del gen que codifica para el *precursor de crf* en el hipotálamo a los **a)** 30 min y **b)** 120 min de la exposición a un protocolo de estrés agudo (manipulación durante 5 min) en carpines previamente inyectados IP con solución salina o melatonina (MEL, 20 µg/g) durante 4 días. Los datos se expresan como la media \pm e.e.m. (n=8/grupo).

La Figura 2.17 resume los resultados de la cuantificación de la expresión de los genes *crf-r1* y *pomc* en la hipófisis de carpines de los 3 grupos experimentales estudiados. Al igual que ocurre con el *precursor de crf*, la expresión de *crf-r1* no se modifica a ninguno de los tiempos estudiados (30 y 120 min), ni por la exposición al estrés ni por el tratamiento previo con MEL, encontrando valores muy similares en todos los casos (Figura 2.17a). Sin embargo, aunque estadísticamente no resulta significativo, el estrés incrementa el número de transcritos del gen *pomc* a los 120 min de la exposición al mismo, aumento que no se observa en el grupo de peces tratados previamente con MEL (20 µg/g) durante 4 días, cuyos valores de expresión son muy similares a los del grupo control (Figura 2.17b). El análisis de correlación de rango de Spearman aplicado a estos valores de expresión de *crf-r1* y *pomc* en los 3 grupos experimentales revela que ambos genes están corregulados positivamente en los peces estresados ($p=0,38$; $p<0,05$).

La expresión génica de *mc2r* y *star* en el riñón de carpines sometidos a un protocolo de estrés agudo y tratados previamente con solución salina o MEL se representa en la Figura 2.18. Los peces estresados parecen presentar, tanto a los 30 como a los 120 min, unos niveles de expresión del gen *mc2r* mayores que el grupo control no estresado, si bien las diferencias entre ambos grupos no son estadísticamente significativas en ninguna de las horas de muestreo (Figura 2.18a). Los peces inyectados con MEL muestran niveles de expresión de *mc2r* similares al grupo estresado e inyectado con salino. En relación a *star*, la exposición a un estrés agudo incrementa significativamente ($p<0,05$) su expresión a los 120 min, pero no a los 30 min, respecto a los controles, efecto que se revierte parcialmente en los peces inyectados con MEL. Esta respuesta es muy similar a la mostrada por *pomc* en la hipófisis a la misma hora de muestreo (Figura 2.17b).

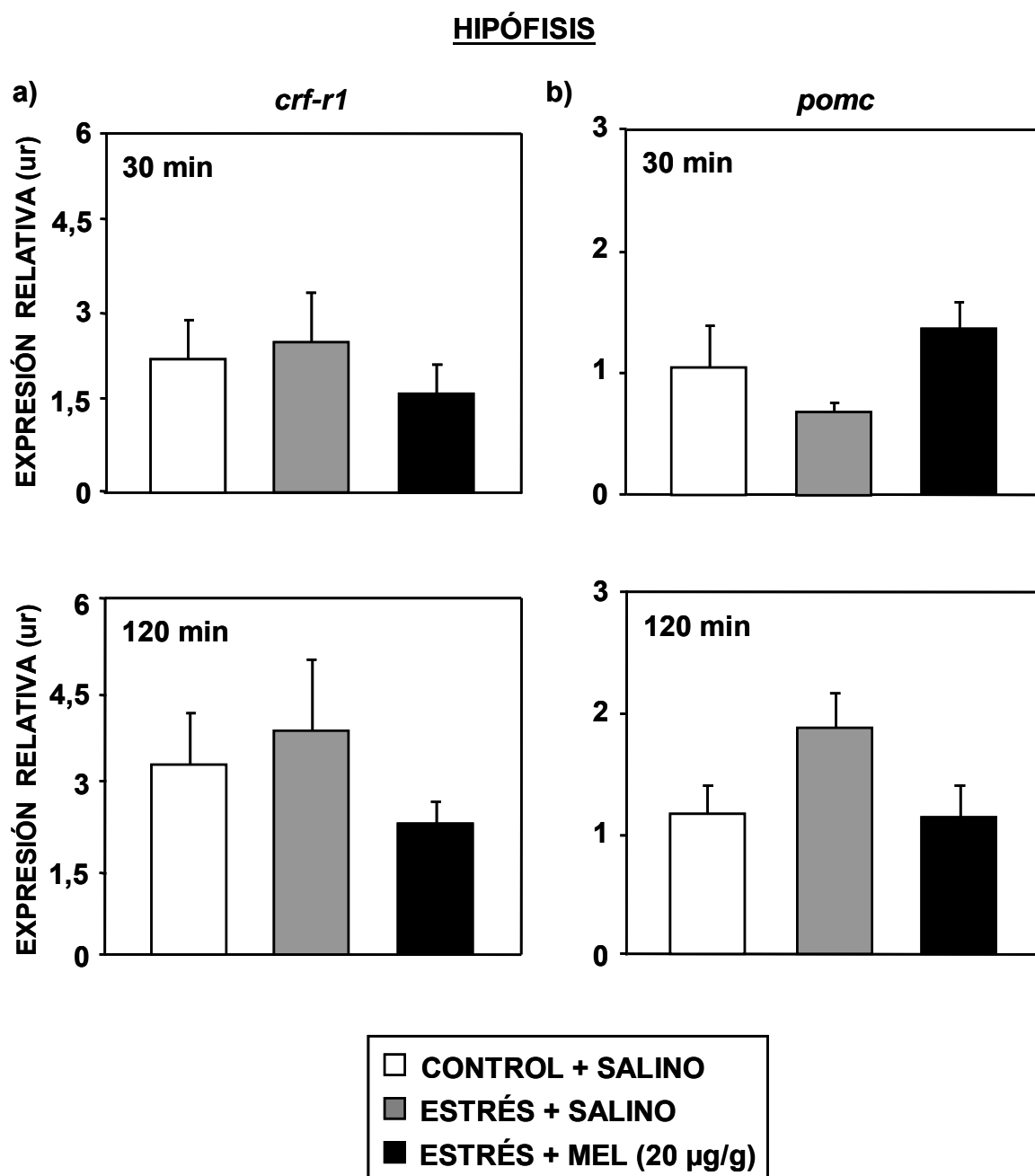


Figura 2.17. Expresión relativa de los genes que codifican para **a)** *crf-r1* y **b)** *pomc* en la hipófisis a los 30 y 120 min de la exposición a un protocolo de estrés agudo (manipulación durante 5 min) en carpines previamente inyectados IP con solución salina o melatonina (MEL, 20 µg/g) durante 4 días. Los datos se expresan como la media \pm e.e.m. (n=8/grupo). El análisis de correlación de rango de Spearman revela que ambos genes están coregulados positivamente en los peces estresados ($p=0,38$; $p<0,05$).

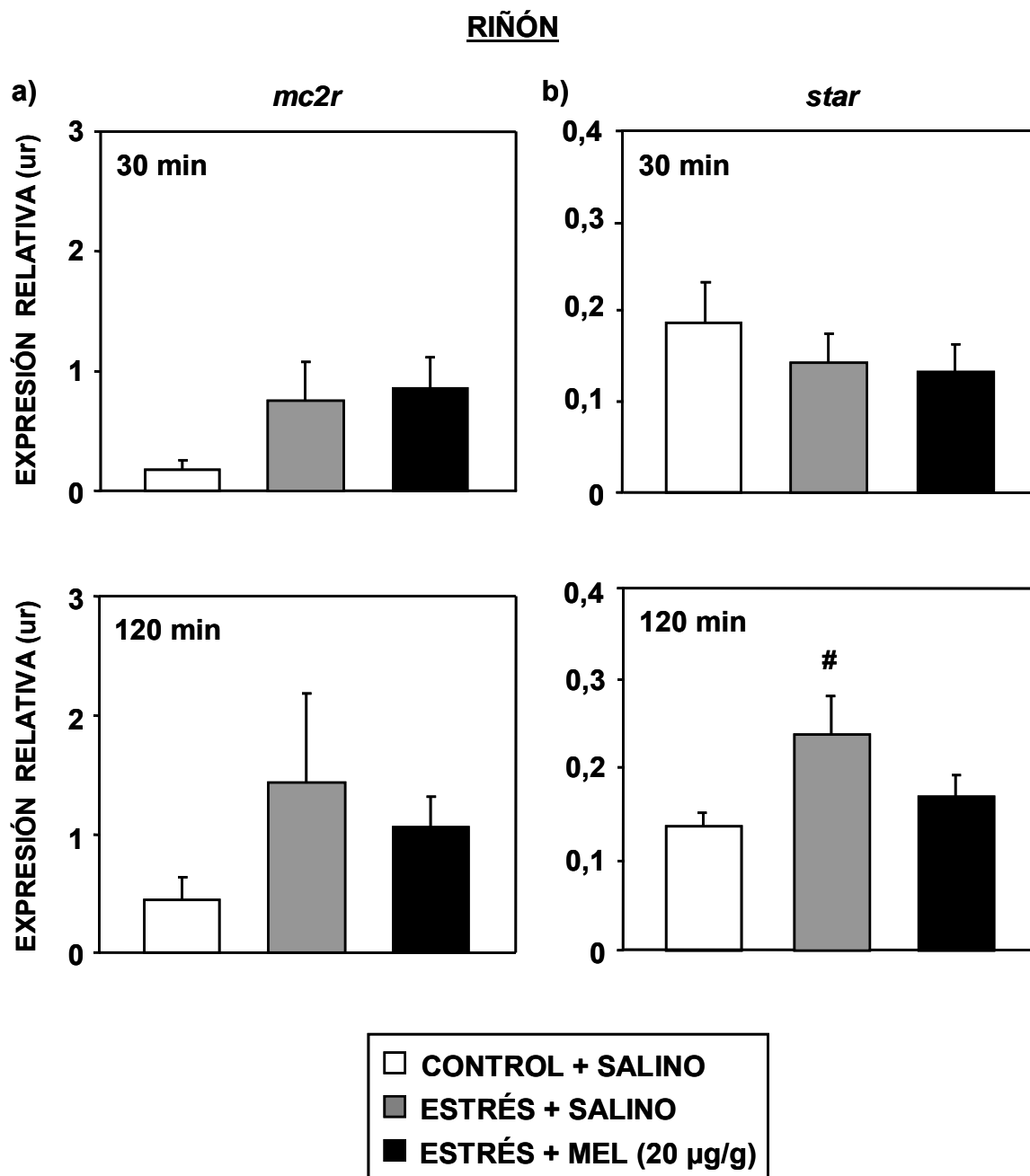


Figura 2.18. Expresión relativa de los genes que codifican para **a) *mc2r*** y **b) *star*** en el riñón a los 30 y 120 min de la exposición a un protocolo de estrés agudo (manipulación durante 5 min) en carpines previamente inyectados IP con solución salina o melatonina (MEL, 20 µg/g) durante 4 días. Los datos se expresan como la media ± e.e.m. (n=8/grupo). #: $p < 0,05$, respecto al grupo control.

II.6. DISCUSIÓN.

Los resultados obtenidos en el presente capítulo revelan que la MEL administrada IP de forma repetida actúa como un agente inhibidor de la actividad locomotora en el carpín. Este resultado corrobora estudios previos realizados en la misma especie por investigadores de la Universidad de Murcia (López-Olmeda *et al.*, 2006a), que también describen una reducción de la actividad locomotora tras la administración IP de dosis de MEL similares a las utilizadas en nuestro estudio. Otros resultados de este capítulo muestran que esta acción relajante de la MEL en el carpín también se observa en condiciones de exposición a estrés, en que una inyección IP de la hormona reduce la actividad locomotora general y la FAA. La MEL promueve estados de reposo y mejora las alteraciones del sueño en mamíferos (Zhdanova *et al.*, 2002, 2005; Arendt y Skene, 2005), y reduce la actividad locomotora en aves (Hau y Gwinner, 1994; Murakami *et al.*, 2001) y reptiles (Hyde y Underwood, 2000). En los peces, la administración de MEL disminuye la actividad locomotora de forma dosis-dependiente e induce posturas características del estado de reposo en el pez cebra, efecto que se revierte con luzindol, por lo que parece tratarse de una acción específica de la hormona (Zhdanova, 2001). Esta reducción de la actividad locomotora inducida por la administración aguda de MEL también se ha descrito en invertebrados (Tanaka *et al.*, 2007), lo que enfatiza el importante grado de conservación de esta función de la MEL como regulador fisiológico de la actividad locomotora diaria a lo largo de la filogenia, al menos en animales diurnos. Sin embargo, las inyecciones de MEL no modifican la actividad locomotora en especies nocturnas de teleósteos (como la tenca; López-Olmeda *et al.*, 2006a), aves (como el búho; Murakami *et al.*, 2001) o mamíferos (como la rata; Aparicio *et al.*, 2006).

Al analizar la evolución de la actividad locomotora a lo largo de varios días de administración IP de MEL encontramos que desde la primera inyección de la hormona se observa una reducción de la actividad, que alcanza el máximo en el 5º día. La recuperación parcial de la actividad diaria total observada en los días posteriores en los carpines tratados con MEL en relación a los controles podría sugerir la aparición de un fenómeno de tolerancia, frecuentemente observado en las acciones endocrinas mediadas por receptores acoplados a proteínas G (Gomperts *et al.*, 2002). En la actualidad, desconocemos el mecanismo que subyace a las acciones de la MEL sobre la actividad locomotora en los peces. Por un lado, cabría pensar en acciones centrales de esta hormona, a través de la regulación de neurotransmisores cerebrales involucrados en el control neural de la actividad locomotora, como el CRF o los sistemas dopaminérgico y/o serotoninérgico (Carpenter *et al.*, 2007; Clements y Schreck, 2007). Sin embargo, el hecho de que la administración ICV de MEL no

modifique ni la actividad locomotora general ni la FAA (Azpeleta *et al.*, 2010) no apoya esta hipótesis. En cambio, la MEL administrada IP sí reduce ambas actividades, lo que sugiere una acción periférica de esta neurohormona en el carpín, si bien no se puede excluir totalmente que una cierta cantidad de la MEL inyectada periféricamente pueda alcanzar el encéfalo (ya que puede cruzar la barrera hematoencefálica), actuando también a nivel central.

Un parámetro muy importante a considerar en los estudios sobre los efectos de la MEL es la hora de administración. En nuestro diseño elegimos una hora antes del inicio de la fase oscura, con el fin de hacer coincidir la elevación de MEL circulante debida a la inyección con el aumento endógeno de la hormona durante la escotofase (Kezuka *et al.*, 1992). Existe una coincidencia generalizada en la bibliografía sobre la idoneidad de esta hora para la administración de MEL en varias especies de vertebrados (Lumineau *et al.*, 2002; Torres-Farfán *et al.*, 2003b).

El análisis de los niveles circulantes de cortisol en los carpines utilizados en nuestro estudio revela que, al igual que sucede con la actividad locomotora, el tratamiento IP con MEL reduce de forma significativa los niveles de este esteroide, pero no los modifica cuando la administración de la hormona es central (ICV). Estos resultados sugieren que en la modulación de la respuesta al estrés, la MEL puede estar actuando a nivel periférico reduciendo la producción y/o liberación de cortisol. Esta función anti-estrés de la MEL parece estar bastante conservada en los vertebrados, habiéndose descrito en varias especies de mamíferos (Konakchieva *et al.*, 1998; Rao *et al.*, 2001; Torres-Farfán *et al.*, 2003b), aves (Saito *et al.*, 2005) y peces (Herrero *et al.*, 2007; Azpeleta *et al.*, 2010). En homeotermos se ha propuesto que la MEL puede actuar a diferentes niveles del eje HPA, produciendo en último término una reducción de los niveles circulantes de glucocorticoides. A nivel hipotalámico, la MEL reduce los niveles de CRF en el pollo y la rata (Konakchieva *et al.*, 1997; Saito *et al.*, 2005), habiéndose identificado receptores MT1 en neuronas hipotalámicas productoras de CRF en humanos (Wu *et al.*, 2006). Además, en los mamíferos la MEL podría ejercer su acción inhibitoria de la esteroideogénesis adrenal mediante una acción directa en la propia glándula, también mediada por receptores MT1 (Rao *et al.*, 2001; Torres-Farfán *et al.*, 2003a; Richter *et al.*, 2008). En los peces, mediante ensayos de radioligando se han detectado receptores funcionales de MEL en el cerebro (Iligo *et al.*, 2003; López-Patiño *et al.*, 2008) y el riñón (Kulczykowska *et al.*, 2006; López-Patiño *et al.*, 2012) de varias especies de teleósteos, apoyando posibles acciones de esta neurohormona tanto a nivel central como periférico. No obstante, nuestros resultados sugieren que el efecto de la MEL reduciendo el cortisol circulante en el carpín se realiza preferentemente a través de dianas periféricas, de forma similar

a su efecto sobre la actividad locomotora. En la presente Tesis Doctoral se han realizado diseños *in vitro* para investigar esta hipótesis (capítulo III).

El comportamiento alimentario en los peces generalmente incluye 3 fases: comienza con la fase de despertar, seguida de la fase apetitiva, en la que se inicia la búsqueda de alimento y finaliza con la fase de consumo, en la que el animal toma el alimento y lo ingiere, o lo rechaza (Lamb, 2001). La mayoría de los estudios sobre la regulación de la alimentación en peces solo analiza la última fase (De Pedro y Börjesson, 2001; Volkoff *et al.*, 2005, 2009). Se sabe que la MEL administrada IP, pero no ICV, reduce la ingesta en el carpín (Pinillos *et al.*, 2001; López-Olmeda *et al.*, 2006a), pero no se conoce el efecto de esta hormona durante las primeras fases del comportamiento alimentario. La actividad anticipatoria al alimento (FAA) se puede considerar parte de esta primera fase, ya que implica el aumento de la actividad locomotora para anticipar la hora de administración del alimento (Sánchez-Vázquez y Madrid, 2001). La inhibición de la FAA encontrada en el presente estudio tras la inyección de MEL sugiere que esta hormona puede estar reduciendo las dos primeras fases del comportamiento alimentario, la de despertar y/o la apetitiva. Estos datos corroboran el importante papel de la MEL en la regulación de la ingesta en el carpín (Pinillos *et al.*, 2001; López-Olmeda *et al.*, 2006a; De Pedro *et al.*, 2008), y en otras especies de teleósteos, como la lubina (Rubio *et al.*, 2004) o la tenca (López-Olmeda *et al.*, 2006a), actuando en las distintas fases que constituyen el comportamiento alimentario en los peces.

El efecto reductor de la MEL en la ingestión de alimento y la actividad locomotora nos lleva a cuestionarnos si el efecto “sedativo” de la indolamina es verdaderamente independiente del anorexigénico, o simplemente se produce como resultado de la menor ingestión de alimento inducida por el tratamiento con la hormona. Con el fin de obtener información sobre esta importante cuestión, diseñamos un modelo de restricción alimentaria (al 50% de la dieta habitual), con el que se pretende averiguar si, por el hecho de comer menos, se ve reducida la actividad locomotora de los carpines. Los resultados obtenidos demuestran de forma contundente que los carpines a los que se les suministró la mitad de la ración diaria de comida, simulando la reducción de la ingesta inducida por la administración de MEL (Pinillos *et al.*, 2001), no se mueven menos que los animales con una disponibilidad completa de alimento. Por tanto, el efecto “sedante” que la MEL induce en el carpín no parece ser una consecuencia de su efecto anoréxico. Datos previos en esta misma especie (Sánchez-Vázquez *et al.*, 1996) y en la tenca (López-Olmeda *et al.*, 2006a) apoyan la existencia de una regulación independiente de ambos parámetros, actividad

locomotora y actividad alimentaria. Otros estudios corroboran esta independencia también en la trucha, habiéndose descrito una estimulación del comportamiento alimentario y una inhibición simultánea de la actividad locomotora en respuesta a la exposición a distintos agentes estresantes (Øverli *et al.*, 2005). Sin embargo, para confirmar la independencia absoluta de ambos parámetros sería necesario demostrar además que la reducción en la actividad locomotora inducida por la MEL no es la responsable de sus acciones anorexigénicas en peces.

Hay que tener presente que la restricción de alimento puede causar un cierto grado de inestabilidad y estrés en los animales (Adam y Epel, 2007). Sin embargo, nuestros resultados indican que una reducción alimentaria del 50% no parece suponer una situación de estrés adicional para los carpines, ya que no se producen modificaciones estadísticamente significativas en los niveles plasmáticos de cortisol tras 10 días de restricción alimentaria respecto a los peces del grupo control. En los peces se han descrito diferentes respuestas de los glucocorticoides al ayuno o a la privación de alimento, encontrando incrementos del cortisol circulante (Peterson y Small, 2004; Olsen *et al.*, 2008), reducciones (Barton *et al.*, 1988) o una falta de respuesta (Cerdá-Reverter *et al.*, 1998; Pottinger *et al.*, 2003). Ante esta variedad de resultados hay que tener presente que factores como el grado de ayuno o el estado nutricional previo de los peces pueden condicionar notablemente la respuesta obtenida, sin olvidar la existencia de una importante variabilidad interespecífica.

Con el fin de caracterizar más ampliamente el efecto relajante de la MEL, realizamos un diseño experimental en el que sometimos a los carpines a un protocolo de estrés agudo. En el análisis de los resultados obtenidos en este tipo de modelos es necesario tener presentes dos consideraciones importantes. Por un lado, en cualquier estudio experimental *in vivo* siempre nos enfrentamos con que el procedimiento de la investigación crea *per se* un cierto estrés en los animales, especialmente cuando requiere una manipulación (sacarlos del agua, inyecciones, extracción de una muestra de sangre, etc.). Por otro lado, hay que tener en cuenta la elevada variabilidad interindividual frecuentemente encontrada en los animales (Wysocki *et al.*, 2006; Hori *et al.*, 2012), debida entre otros factores a la distinta sensibilidad individual a los agentes potencialmente estresantes. El protocolo de estrés agudo empleado en el presente estudio, consistente en la exposición de los carpines al aire durante 1 min, es un modelo sencillo, efectivo, del que los animales se recuperan con rapidez, y compatible con la ejecución del diseño experimental, ya que no interfiere con el proceso de inyecciones, toma de muestras, etc. Por otra parte, se han considerado dos condiciones de mantenimiento de los carpines, aislados y agrupados, en función

de los objetivos del diseño. El mantenimiento de los peces aislados presenta la ventaja de poder obtener datos individuales, tanto de actividad locomotora como de ingesta y niveles de cortisol, mientras que realizar el estudio con peces agrupados permite la interacción y sincronización social entre los individuos.

El modelo de estrés agudo empleado ha resultado efectivo en base al incremento observado en el cortisol circulante, indicador universal de estrés en los peces. En nuestro modelo hemos encontrado una respuesta rápida al estrés, con un incremento significativo del cortisol a los 30 min, que se mantiene elevado al menos durante 2 h. Una respuesta similar se ha descrito en otros modelos de estrés agudo aplicados en otras especies de peces (Barcellos *et al.*, 2005; Davis y Small, 2006; Schjolden *et al.*, 2006; Van der Salm *et al.*, 2006; Cnaani y McLean, 2009), si bien la tasa de aumento del cortisol circulante está relacionada con otros muchos factores, como el tipo de agente estresante y su intensidad, el tiempo de exposición, la temperatura o la especie. Así, en situaciones de estrés más severo el cortisol puede llegar a incrementar de 6 a 10 veces sus niveles basales (Barcellos *et al.*, 2005; Karakatsouli *et al.*, 2008).

La glucemia es otro de los parámetros más ampliamente utilizados como indicador de la respuesta al estrés en los peces (Wendelaar Bonga, 1997). El perfil temporal general de los cambios en la glucosa circulante en respuesta a un estrés agudo implica un aumento en los minutos siguientes a la perturbación, que se prolonga durante todo el tiempo de exposición, alcanzando su valor máximo tras 1-2 h y recuperando los niveles basales tras 2-4 h (Barcellos *et al.*, 1999, 2005; Caruso *et al.*, 2005; Van der Salm *et al.*, 2006; Davis y Small, 2006) o ligeramente después (Arends *et al.*, 1999). Se han descrito ciertas variaciones de este patrón temporal, con recuperaciones más lentas de la glucemia basal (superiores a 24 h) (Jentoft *et al.*, 2005; Olsen *et al.*, 2008). En nuestro estudio no hemos encontrado diferencias significativas en la glucemia en los distintos grupos experimentales, en coincidencia con resultados previos hallados en el pez espátula (*Polyodon spathula*; Barton *et al.*, 1998) o en el rodaballo (*Scophthalmus maximus*; Waring *et al.*, 1996). Es importante tener presente que la concentración de glucosa en sangre es un parámetro que depende fuertemente de otros factores, como la dieta o el estado nutricional del animal, a diferencia del cortisol, cuyos niveles reflejan de forma directa la actividad del eje HPI. De manera general, la rápida movilización de glucosa en respuesta al estrés depende de la liberación de catecolaminas, mientras que en el mantenimiento de una glucemia elevada a largo plazo interviene principalmente el cortisol circulante (Barton *et al.*, 2002).

La glucemia tampoco se modifica por el tratamiento agudo con MEL en el carpín, de forma similar a lo descrito previamente tras la administración crónica de la hormona en esta misma especie en condiciones basales (De Pedro *et al.*, 2008), y en la trucha arco iris y el lenguado estresados de manera crónica (Conde-Sieira, 2012; López-Patiño *et al.*, 2013). De hecho, es probable que el papel fisiológico de la MEL en la modulación de los sistemas glucosensores hipotalámicos no esté relacionado con su papel anti-estrés (Conde-Sieira *et al.*, 2012a). No obstante, la acción de esta indolamina sobre la glucemia en peces no está todavía clara, existiendo datos variables en función de la dosis, el tratamiento o el momento del día (Delahunty *et al.*, 1978; Delahunty y Tomlinson, 1984; Soengas *et al.*, 1998; Conde-Sieira *et al.*, 2012b).

Aunque la mayoría de los estudios realizados demuestran que el estrés reduce la ingestión de alimento, la respuesta alimentaria al estrés parece ser dual, pudiendo encontrar incrementos o reducciones de la ingesta dependiendo del tipo de agente estresante y de su intensidad (Kulczykowska y Sánchez-Vázquez, 2010; Maniam y Morris, 2012). Nuestros resultados ponen de manifiesto una reducción significativa de la ingesta inducida por la exposición de los peces al aire durante 1 min. Esta respuesta comportamental de inhibición del apetito inducida por estrés agudo se ha evidenciado en numerosos estudios previos realizados en diferentes especies de peces (Carr, 2002; Hoskonen y Pirhonen, 2006; Liebert y Schreck, 2006; Conde-Sieira *et al.*, 2010a). Los mecanismos que subyacen a la regulación de la ingesta por estrés son complejos y multifactoriales, admitiéndose que reguladores como el CRF y la urotensina I son mediadores endógenos de la inhibición del apetito inducida por estrés en peces (Bernier y Craig, 2005; Bernier, 2006). Datos previos en el carpín apoyan esta propuesta, al demostrar una potente acción anorexigénica de ambos neuropéptidos en esta especie (De Pedro *et al.*, 1993; Bernier y Peter, 2001b). Otros reguladores anorexigénicos centrales que también pueden responder al estrés son la 5-HT y las melanocortinas. En la trucha se ha descrito que la tasa de recambio serotoninérgico aumenta tras la exposición al estrés, estando implicada en la inhibición del apetito y liberación de glucocorticoides (Øverli *et al.*, 1998). En el carpín, la 5-HT desarrolla una acción central anoréxica mediada, al menos en parte, por el CRF (De Pedro *et al.*, 1998b). El efecto anorético de las melanocortinas ha sido demostrado previamente en el carpín (Cerdá-Reverter y Peter, 2003; Cerdá-Reverter *et al.*, 2003; Shimakura *et al.*, 2008); además, la liberación de estos péptidos aumenta tras la exposición a estrés, en casos de elevada sensibilidad al CRF (Van den Burg *et al.*, 2005), por lo que las melanocortinas también pueden considerarse mediadores del efecto anorexigénico del estrés en los peces. Entre los posibles reguladores periféricos de la ingesta implicados en la respuesta anorética al estrés cabe destacar a la

ghrelina, la leptina y el propio cortisol, como producto final de la activación del eje HPI por el estrés. Concretamente, estudios en trucha arco iris y tilapia señalan que el estrés agudo y/o los niveles elevados de cortisol suprimen los niveles plasmáticos de ghrelina, resultando en una menor ingesta (Pankhurst *et al.*, 2008; Janzen *et al.*, 2012). En cuanto a la leptina, en mamíferos se ha demostrado que sus niveles son incrementados directamente por los glucocorticoides (Copeland *et al.*, 2011), mientras que en peces, la hipoxia incrementa la expresión de leptina (Chu *et al.*, 2010) y de su receptor (Wong *et al.*, 2007), lo que sugiere que la anorexia inducida por la exposición al estrés podría estar mediada por esta proteína.

No existen datos concluyentes sobre el papel del cortisol en la regulación de la ingesta en peces, ya que los efectos de la administración de este esteroide tanto por vía oral como en forma de implantes son muy variados dependiendo de la especie, la dosis y la duración del tratamiento (Bernier *et al.*, 2004). Así, se ha descrito que el cortisol reduce la ingesta en la trucha arco iris (Gregory y Wood, 1999) y la tilapia (Janzen *et al.*, 2012), mientras que en el carpín puede aumentarla o no producir modificaciones significativas de la misma (De Pedro *et al.*, 1997; Bernier *et al.*, 2004). Por último, conviene mencionar que el estrés también puede causar diferentes alteraciones en el tracto gastrointestinal de los peces, que pueden resultar en una reducción de la ingesta (Olsen *et al.*, 2005, 2008).

Uno de los hallazgos más relevantes del presente estudio es la reversión por la inyección de MEL de los dos efectos producidos por la exposición al estrés agudo (el aumento de cortisol y la reducción de la ingesta), lo que nos permite sugerir un papel “anti-estrés” para la MEL en los peces. Un efecto similar se ha descrito en aves, donde la MEL reduce los niveles de corticosterona incrementados en un modelo de estrés por aislamiento (Saito *et al.*, 2005). La reversión de la reducción de la ingesta inducida por estrés observada en los grupos tratados con MEL apoya estudios previos que han demostrado que el triptófano, precursor de la MEL, también revierte la anorexia inducida por estrés en la trucha común, *Salmo trutta* (Höglund *et al.*, 2007). Estos resultados parecen contrastar con las acciones anoréxicas descritas para la MEL en peces (Pinillos *et al.*, 2001; Rubio *et al.*, 2004; López-Olmeda *et al.*, 2006a). No obstante, es importante considerar las diferencias en los diseños experimentales empleados: un modelo de estrés en el presente estudio frente a la utilización de carpines no estresados en estudios previos (Pinillos *et al.*, 2001; López-Olmeda *et al.*, 2006a). Otro factor a considerar es la dosis de MEL administrada, ya que se ha demostrado que dosis de 20 y 200 µg/g reducen la ingesta en el carpín, mientras que dosis inferiores (2 µg/g) no tienen efecto (Pinillos *et al.*, 2001). Además, hay que tener en cuenta que la MEL interacciona con numerosos neuropéptidos reguladores de la

ingesta. Estudios recientes *in vitro* en trucha han demostrado que la MEL aumenta la expresión hipotalámica de péptidos orexigénicos (NPY) y reduce la de péptidos anorexigénicos (CRF, POMC y transcrito regulado por cocaína y anfetamina-CART) (Conde-Sieira *et al.*, 2012a), lo que conduciría a un incremento de la ingestión de alimento frente a la anorexigenia inducida por estrés, como la observada en el presente estudio. Sin embargo, experimentos *in vivo* muestran otros efectos de la MEL, incrementando la leptina y disminuyendo el NPY y la ghrelina en el pez cebra (Piccinetti *et al.*, 2010), e incluso una falta de efecto en el carpín (De Pedro *et al.*, 2008). Todos estos resultados sugieren una compleja interacción de la MEL con los distintos sistemas reguladores de la ingesta, pudiendo originar en último término diferentes respuestas alimentarias.

El hecho de que la dosis más alta de MEL empleada en el presente estudio (20 µg/g) revierta sólo parcialmente el efecto anorexigénico inducido por el estrés, nos lleva a pensar que la acción inhibidora de la ingesta descrita para esta dosis en estudios previos (Pinillos *et al.*, 2001) puede estar presente también en un modelo de estrés como el aplicado. En definitiva, la ingesta observada en el grupo de peces estresados e inyectados con la dosis más alta de MEL vendrá determinada finalmente por el balance entre sus acciones “anti-estrés” (orexigénicas de modo indirecto) y como señal periférica de saciedad, lo que explicaría la menor ingestión de alimento mostrada por este grupo de peces tanto respecto a los controles como a los peces inyectados con la dosis menor de MEL (2 µg/g).

El modelo de estrés agudo utilizado en el presente estudio no alteró de forma significativa el patrón de actividad locomotora en individuos aislados, corroborando estudios previos en el pez gato africano (*Clarias gariepinus*), donde el aislamiento *per se* no actúa como un factor estresante (Martins *et al.*, 2006). Sin embargo, en los peces agrupados el estrés aplicado parece modificar el patrón diario de actividad. En relación a las posibles alteraciones de la actividad locomotora inducidas por estrés, se han publicado resultados variados en peces que no permiten por el momento establecer conclusiones sencillas. Así, una hiperactividad ha sido asociada al estrés, vía CRF en salmónidos (Clements *et al.*, 2002; Øverli *et al.*, 2005; Carpenter *et al.*, 2007; Clements y Schreck, 2007), efecto que a su vez parece estar mediado por una activación serotoninérgica (Winberg *et al.*, 1997; Clements *et al.*, 2003; Clements y Schreck, 2007), así como por otros neurotransmisores, como GABA o dopamina (Winberg y Nilsson, 1993; Winberg y Lepage, 1998; Clements y Schreck, 2004; Carpenter *et al.*, 2007). Los efectos del cortisol sobre la actividad locomotora también dependen de factores como la dosis, la hora del día o el contexto comportamental (grado de agresividad) de los peces (Øverli *et al.*, 2002, 2005; Carpenter *et al.*, 2007).

En el último experimento del presente capítulo, el protocolo de estrés agudo utilizado (5 min de manipulación) incrementa los niveles circulantes de cortisol en una magnitud similar al modelo de estrés aplicado con anterioridad (1 min de exposición al aire), garantizando la validez de este nuevo modelo. En cambio, a diferencia del aquél, la exposición a 5 min de manipulación produce, además, un aumento significativo de la glucosa y el lactato circulantes, indicadores clásicos de respuesta secundaria a estrés (Wendelaar Bonga, 1997). Los incrementos de cortisol y glucosa observados coinciden con los obtenidos previamente en carpines y en otras especies de teleósteos sometidos a protocolos de estrés similares, y que ya han sido discutidos en este capítulo. Los niveles de lactato circulante, producto del metabolismo anaerobio de la glucosa por un aporte de oxígeno a los tejidos menor a sus necesidades metabólicas, aumentan especialmente en situaciones de estrés por hipoxia o por exposición a agentes que inducen una mayor actividad muscular (Barton *et al.*, 1998; Arends *et al.*, 1999; Rotllant *et al.*, 2001; Van der Salm *et al.*, 2006). En el estrés por manipulación aplicado en nuestro estudio, los carpines fueron expuestos al aire (hipoxia) y perseguidos con un salabre (aumentando su actividad muscular), lo que justificaría el incremento de lactato observado.

El tratamiento con MEL (20 µg/g) durante 4 días revirtió el incremento de cortisol (que llega a alcanzar los niveles basales previos al estrés) y de lactato (de forma no significativa), sin afectar a la glucemia. Los resultados en relación al cortisol y la glucosa coinciden con los obtenidos tras una administración aguda de MEL a carpines estresados (apartado 4 de este capítulo), por lo que podría tratarse de un efecto producido por la última inyección de la hormona, y no necesariamente por el tratamiento de los días previos. El incremento de lactato plasmático tras la exposición a una situación de estrés físico de corta duración es revertido por la administración de MEL, tanto de forma aguda (Mazepa *et al.*, 2000) como crónica (Kaya *et al.*, 2006) en los mamíferos, sugiriendo que esta hormona optimiza la respuesta del organismo ante el estrés reduciendo el agotamiento muscular. En peces, los resultados publicados son variables dependiendo de la especie: mientras que la MEL no modifica los niveles circulantes de lactato en condiciones de estrés crónico en la trucha arco iris (Conde-Sieira, 2012), los reduce en el lenguado (López-Patiño *et al.*, 2013), pudiendo justificarse estas variaciones en base a los diferentes modelos de estrés aplicados y los mecanismos activados en respuesta a ellos.

Uno de los genes analizados en este estudio, el que codifica para el receptor de melanocotinas tipo 2 (MC2R), aun no estaba secuenciado en carpín, por lo que en primer lugar realizamos su secuenciación parcial. El fragmento obtenido tiene una longitud de 460 pb que codifican para 130 aminoácidos. Los análisis estructurales y de

identidad de secuencia confirman que la proteína conserva una homología de aproximadamente el 50% con los mamíferos, 60% con los tetraodóntidos y 70% con la trucha arco iris, siendo máxima con los ciprínidos (89% con el pez cebra, 94% con la carpa). A diferencia de otros genes, que presentan dos isoformas a consecuencia de la duplicación cromosómica experimentada por los teleósteos (Jaillon *et al.*, 2004), el MC2R solo presenta una, posiblemente debido a la pérdida de algunas copias posteriormente a dicho proceso de duplicación (Klovins *et al.*, 2004; Haitina *et al.*, 2007). Al igual que el resto de receptores de melanocortinas (MCRs), el MC2R está constituido por 7 dominios transmembrana (TM), de los cuales 5 están incluidos en el fragmento secuenciado (3 completos y 2 parciales), y se encuentra unido a la subunidad α de las proteínas G por su región intracelular. La unión de la ACTH (único ligando del MC2R; Aluru y Vijayan, 2008; Veo *et al.*, 2011) activa esta proteína G, estimulando la adenilato ciclasa y aumentando la producción de AMPc, la activación de PKA y el transporte de colesterol al interior de la mitocondria, donde comienza la esteroidogénesis (Penhoat *et al.*, 2001). La activación de las proteínas G conlleva una serie de cambios conformacionales en el receptor, cuya clave se cree que es una secuencia de aminoácidos denominada motivo DRY (ácido aspártico/arginina/tirosina) localizada en la unión entre el dominio TM3 y el bucle intracelular 2 (Rovati *et al.*, 2007). Este motivo está altamente conservado y forma parte de todas las secuencias alineadas en nuestro estudio, así como de los MCRs de otras especies de peces y anfibios (Baron *et al.*, 2009), lo que apoya su relevancia. Todas las secuencias analizadas muestran además un residuo de serina/treonina muy cercano al dominio DRY, cuya posición está muy conservada en los receptores acoplados a proteínas G y que es susceptible de ser fosforilado por PKC (Lembo *et al.*, 1997). En humanos, la mutación de este residuo puede interferir con el motivo DRY adyacente y crear un importante cambio estructural en el receptor que alteraría, entre otros, el acoplamiento de la proteína G o el correcto plegamiento del receptor, lo que podría modificar su afinidad por la ACTH (Lembo *et al.*, 1997; Moore *et al.*, 2002; Kushwaha *et al.*, 2006; Roy *et al.*, 2011). También en humanos, se han descrito otros residuos de serina/treonina, cuyas sustituciones podrían alterar la funcionalidad del receptor (Roy *et al.*, 2011). Uno de ellos está incluido en el fragmento secuenciado en carpín (posición 25) y es común en todas las secuencias alineadas. En la carpa, este residuo representa un posible lugar de fosforilación por PKC (Metz *et al.*, 2005), y en humanos se ha relacionado con el proceso de internalización del receptor, uno de los mecanismos implicados en la regulación de la respuesta al estrés (Kilianova *et al.*, 2006). Las secuencias de ciprínidos (incluida la de carpín), aunque no las de otras familias de peces (Baron *et al.*, 2009), presentan además un potencial sitio de

glucosilación, cuya secuencia (AAT) concuerda con la secuencia consenso AXT (siendo X un aminoácido sin especificar; Marshall, 1972). Aunque se conoce poco sobre las funciones de los sitios de glucosilación en los MCRs, parece probable que, al igual que los sitios de fosforilación, estén implicados en la regulación de la función del receptor (Dohlman *et al.*, 1991).

El modelo de estrés aplicado en el presente estudio no modifica de forma significativa la expresión del *precursor de crf*, si bien se observa un incremento en los peces estresados respecto al grupo control en los 120 min posteriores a la exposición al estrés. Estudios en la carpa (Huising *et al.*, 2004) y la platija (*Platichthys flesus*) (Lu *et al.*, 2004) aplicando un estrés de corta duración también muestran un aumento en los niveles plasmáticos de cortisol sin que se modifique significativamente la expresión del *crf* hipotalámico. En la trucha arco iris, se ha demostrado que la susceptibilidad individual al estrés condiciona la respuesta transcripcional de este gen (Backström *et al.*, 2011). Asimismo, parece que tiempos mayores de exposición a estrés incrementan la expresión de *crf* hipotalámico en peces, aunque la respuesta temporal observada depende en gran medida del tipo de estrés aplicado (Doyon *et al.*, 2003; Huising *et al.*, 2004; Bernier y Craig, 2005; Craig *et al.*, 2005). Por tanto, podría ocurrir que nuestro modelo de estrés, siendo suficientemente intenso y duradero para producir una respuesta primaria e incrementar el cortisol circulante, no tenga la suficiente severidad para inducir cambios significativos en la expresión del *precursor de crf*. Por otra parte, estudios en el pez cebra (Ghisleni *et al.*, 2012), el carpín (Bernier *et al.*, 1999) y la tilapia (Pepels *et al.*, 2004) sugieren que esta ausencia de diferencias significativas en la expresión del *crf* podría deberse a un mecanismo de retroalimentación negativa producido por el incremento del cortisol circulante, si bien el moderado incremento de cortisol observado y el escaso tiempo transcurrido desde la exposición al estrés hasta el momento del muestreo nos inclinan a descartar esta posibilidad en nuestro estudio, de forma similar a lo descrito en la carpa (Stolte *et al.*, 2008).

El modelo de estrés aplicado tampoco modificó la expresión del *crf-r1* a ninguno de los tiempos muestreados. De la misma forma, 30 o 180 min de confinamiento no modifican la expresión de este gen en el cerebro completo de la trucha arco iris (Backström *et al.*, 2011), mientras que en el área preóptica se observa un aumento a medida que se incrementa la duración del estrés hasta al menos 4 h (Doyon *et al.*, 2005). En la hipófisis de carpa, la expresión de este gen disminuye tras 24 h de exposición a estrés por confinamiento, pero no se tienen datos de posibles cambios a tiempos menores (Huising *et al.*, 2004). Por tanto, es posible que el modelo de estrés aplicado en nuestro estudio no tenga la suficiente duración como para estimular la expresión del receptor de CRF. Por otra parte, en la rata se ha propuesto que para

lograr la máxima estimulación de la producción de ACTH basta con la activación de un pequeño número de receptores de CRF, no existiendo una dependencia del número de CRF-R1 activos y sus niveles de ARNm (Aguilera *et al.*, 2004), lo que podría explicar la ausencia de cambios en la expresión de este gen en nuestro estudio. Además, se ha planteado la posibilidad de que los mecanismos post-transcripcionales desempeñen un papel importante en el contenido hipofisario del receptor y en su actividad (Aguilera *et al.*, 2004; Klenerova *et al.*, 2008).

El modelo de estrés aplicado en nuestro estudio aumenta la transcripción de *pomc* a los 120 min de la exposición, aunque de forma no significativa. En cambio, 1 h de exposición a niveles bajos de agua incrementa la expresión de *pomc* en el pez gato (Karsi *et al.*, 2005) mientras que 2 h de confinamiento en la trucha arco iris aumentan la expresión del gen en las 4 h posteriores (Gilchriest *et al.*, 2000). Por tanto, el tipo y la severidad del agente estresante parecen ser factores importantes en la inducción de la expresión de *pomc*. Aunque la expresión de este gen puede considerarse como una medida indirecta de la producción de ACTH, hay que tener presente el diferencial procesamiento post-transcripcional de este precursor, que necesariamente puede modificar el contenido de ACTH hipofisario.

El análisis de correlación de rango de Spearman indica una correlación positiva significativa para *crf-r1* y *pomc*. Por tanto, a pesar de la ausencia de diferencias significativas entre tratamientos, este test revela una relación clara entre la expresión de *crf-r1* y *pomc* y la exposición al estrés, apoyando la relevancia de los aumentos observados en la expresión de ambos genes en respuesta a dicho estrés.

Los resultados obtenidos en relación a la expresión de *mc2r* muestran incrementos en la transcripción del gen a los 120 min de la exposición (que empiezan a evidenciarse a los 30 min), aunque dichos cambios tampoco resultan ser estadísticamente significativos. Resultados similares se han publicado en la trucha, en la que un protocolo de estrés similar no modifica de forma significativa la expresión de *mc2r* hasta las 4 h post-estrés (Aluru y Vijayan, 2008) proponiéndose que el desfase entre el inicio del estrés y la transcripción de *mc2r*, que no sucede con *star* o *p450scc* (Aluru y Vijayan, 2006), puede deberse a la existencia de mecanismos moleculares adicionales a la señalización por ACTH que estarían regulando la esteroidogénesis adrenal. Esta hipótesis ha sido propuesta también por otros autores en la misma especie (Pottinger y Carrick, 2001). Nuestros resultados apoyarían esta posibilidad, ya que a pesar de la ausencia de cambios significativos en la expresión del resto de genes analizados, se observa un incremento significativo de la expresión de *star* a las 2 h post-estrés. En la dorada, la exposición a un estrés similar también induce un aumento significativo en la expresión de *star* al menos 6 h después de la retirada del

agente estresante (Castillo *et al.*, 2008), si bien la respuesta transcripcional de este gen y de otros que codifican para enzimas esteroidogénicas (como *p450scc*) parece depender del tipo de estrés, como se ha descrito para la trucha arco iris (Geslin y Auperin, 2004).

La ausencia de diferencias significativas en la expresión de los genes analizados, a pesar del incremento en los niveles circulantes de cortisol, también podría explicarse en base a la idea de que en la generación de una respuesta inmediata a la exposición al estrés, se movilizan en primer lugar las posibles reservas de los distintos activadores del eje HPI y, posteriormente, para prolongar los niveles de cortisol circulante elevados, se activarían mecanismos transcripcionales conducentes a la restauración de dichas reservas intracelulares. Esta teoría ha sido propuesta anteriormente para el CRF, en peces y en mamíferos (Huising *et al.*, 2004; Watts *et al.*, 2004; Watts, 2005; Backström *et al.*, 2011).

Las tendencias descritas de aumentos en la expresión de *crf-r1*, *pomc* y *star* inducidos por el estrés agudo se revierten por el tratamiento con MEL, sin que se modifique la expresión de *precursor de crf* y *mc2r*. Existe abundante información previa sobre efectos de la MEL a nivel hipotalámico-hipofisario en relación con funciones como la reproducción, pero apenas se han realizado estudios de posibles acciones en la fisiología del eje HPI ante respuestas al estrés. La mayoría de la información disponible se refiere al efecto de la hormona sobre la síntesis y/o liberación de los péptidos intermediarios en la activación del eje HPA/HPI, y ha sido discutida con anterioridad en este capítulo, no existiendo apenas datos que relacionen a la MEL con la expresión de genes funcionales del eje adrenal. El presente estudio es el primero en abordar esta cuestión en los peces, y los resultados obtenidos, en los que la MEL reduce la expresión de *star* en el riñón de los carpines estresados, concuerdan con datos previos publicados en mamíferos. En ellos, el tratamiento con MEL disminuye los niveles de expresión de *star* en células de Leydig de ratón (Wu *et al.*, 2001). Además, otros estudios también realizados en mamíferos sugieren que la MEL ejerce su efecto reductor de la esteroidogénesis adrenal actuando en etapas posteriores a la síntesis de AMPc (por activación de MC2R) y anteriores a la acción de la desmolasa mitocondrial (Wu *et al.*, 2006; Torres-Farfán *et al.*, 2003a). Finalmente, los presentes resultados *in vivo* también apoyan los obtenidos *in vitro* en el capítulo III de esta Memoria, que señalan al tejido interrenal como una de las dianas a través de las cuales la MEL reduce los niveles de cortisol plasmático en los peces.

CAPÍTULO III

POSIBLES DIANAS DE LA MELATONINA EN EL EJE HIPOTÁLAMO-HIPÓFISIS-INTERRENAL DE TELEÓSTEOS

RESUMEN III

El eje hipotálamo-hipófisis-interrenal (HPI) es el principal sistema neuroendocrino implicado en la respuesta al estrés en los teleósteos. El factor liberador de corticotropina (CRF) hipotalámico se libera tras la exposición a factores estresantes, estimulando la producción de adrenocorticotropina (ACTH) por la hipófisis, que a su vez activa a las células esteroidogénicas del tejido interrenal para finalmente producir y liberar cortisol. Estudios previos en el carpín demuestran que la melatonina administrada de manera periférica reduce los niveles de cortisol plasmático, tanto en condiciones basales como de exposición a estrés. El objetivo del presente estudio es investigar posibles dianas para este efecto de la melatonina en el eje HPI.

En primer lugar, se realiza un experimento preliminar de activación del eje HPI mediante la administración exógena de ACTH (50 y 200 ng/g), analizando sus efectos sobre parámetros fisiológicos y comportamentales en el carpín. Los resultados muestran que la inyección de ambas dosis desencadena una respuesta primaria al estrés, con un incremento significativo de los niveles plasmáticos de cortisol, sin afectar a otros metabolitos circulantes (glucosa y lactato) ni a parámetros comportamentales (ingesta y actividad locomotora). A partir de estos resultados, diseñamos un experimento posterior, con el que se pretende determinar si la inyección intraperitoneal de melatonina (20 µg/g) es capaz de contrarrestar la estimulación del eje HPI inducida por CRF (1 µg/µl, inyección intracerebroventricular) o ACTH (50 ng/g, inyección intraperitoneal). La administración de ambos péptidos induce una estimulación esperable del eje HPI, con un incremento significativo en los niveles de cortisol circulante a las 2 h de las inyecciones, efecto que no es revertido por el tratamiento previo con melatonina. Por tanto, la activación suprafisiológica del eje HPI parece enmascarar el efecto de la melatonina reduciendo el cortisol circulante, que sí se observa en estudios previos en condiciones de exposición a estrés en este mismo teleósteo (capítulo II).

Para investigar si la reducción del cortisol inducida por la melatonina se ejerce de forma directa a nivel del tejido interrenal, se realizan ensayos *in vitro* con dicho tejido, comparando la respuesta en dos especies de teleósteos: el carpín y la trucha arco iris. El tejido interrenal del carpín se cultiva en dos sistemas, en superfusión y estático, analizando el efecto de la melatonina (1-100 nM), con o sin luzindol (antagonista general de los receptores de melatonina, 1 µM) sobre el tejido estimulado con ACTH (50 nM). El tejido interrenal de la trucha se cultiva en un sistema estático y se estimula con ACTH (1,3 µM) en presencia de melatonina (0,1-10 nM), con o sin

luzindol (1 μ M). La melatonina (1-100 nM) reduce la cantidad total y el máximo nivel de cortisol liberado por el tejido interrenal del carpín estimulado con ACTH, sin modificar la liberación basal. Además, la recuperación de los niveles basales de cortisol tras la estimulación es más rápida en los tejidos tratados con melatonina. Estos efectos de la neurohormona parecen estar mediados por receptores melatoninérgicos específicos, ya que se revierten, al menos en parte, con el pretratamiento con luzindol. En la trucha arco iris, los resultados son muy similares a los encontrados en el carpín, con una reducción de la liberación de cortisol estimulada por ACTH tras la adición de melatonina (0,1-10 nM) y una reversión significativa de este efecto tras la preincubación con luzindol. En la actualidad desconocemos el mecanismo por el que la melatonina realiza este efecto en los peces, si bien estudios *in vitro* en mamíferos proponen una acción inhibitoria de la actividad de enzimas implicadas en la esteroidogénesis, mediada a través de receptores MT1 presentes en la glándula adrenal.

Nuestros resultados señalan al tejido interrenal de los teleósteos como una posible diana sobre la que la melatonina, a través de receptores específicos, puede ejercer su acción reductora del cortisol plasmático.

SUMMARY III

Hypothalamus-pituitary-interrenal (HPI) axis is the main neuroendocrine system involved in the stress responses in teleosts. Hypothalamic corticotropin releasing factor (CRF) is released after stress exposure, stimulating adrenocorticotropin (ACTH) production by the pituitary, which activates steroidogenic cells in the interrenal tissue to finally produce and release cortisol. Previous studies in goldfish demonstrate that peripheral administration of melatonin reduces plasma cortisol levels, in both basal and stressful situations. The aim of the present study is to investigate the possible targets for this effect of melatonin on the HPI axis.

First, a preliminary experiment of HPI axis activation by exogenous administration of ACTH (50 and 200 ng/g) is performed, analysing its effects on physiological and behavioural parameters in goldfish. Results show that both doses of the peptide trigger a primary response to stress, with a significant increase in plasma cortisol levels, without affecting other circulating metabolites (glucose and lactate) or behavioural parameters (food intake and locomotor activity). From these results, we perform the following experiment to determine whether intraperitoneal injection of melatonin (20 µg/g) is able to counteract the HPI axis stimulation induced by CRF (1 µg/µl, intracerebroventricular injection) or ACTH (50 ng/g, intraperitoneal injection). The administration of both peptides induces the expected stimulation of HPI axis, with a significant increase in circulating cortisol at 2 h post-injections. This effect is not counteracted by the previous treatment with melatonin. Thus, supraphysiological activation of HPI axis seems to mask the melatonin-induced reduction of circulating cortisol, previously observed in physiological responses to stress in this teleost (chapter II).

To investigate whether cortisol reduction induced by melatonin is exerted by a direct action on interrenal tissue, *in vitro* assays are performed, comparing the response of two teleost species: goldfish and rainbow trout. Goldfish interrenal tissue is cultured in two systems, superfusion and static, analysing the effect of melatonin (1-100 nM), with or without luzindole (a general antagonist of melatonin receptors, 1 µM), on ACTH-stimulated tissue (50 nM). Trout interrenal tissue is cultured in a static system and stimulated with ACTH (1,3 µM) in the presence of melatonin (0,1-10 nM), with or without luzindole (1 µM). Melatonin (1-100 nM) reduces the total amount and the maximum level of cortisol released by ACTH-stimulated goldfish interrenal tissue, without modifying basal release. Besides, the recovery of basal levels after ACTH stimulation is faster in the tissues treated with melatonin. These effects of the neurohormone seem to be mediated by melatonergic receptors, as they are reversed,

at least partially, by luzindole pre-treatment. In rainbow trout, results are very similar to the ones found in goldfish, with a reduction in ACTH-stimulated cortisol release after melatonin addition (0,1-10 nM) and a significant reversion of this effect after pre-incubation with luzindole. At present, the mechanism underlying this effect of melatonin in fish is unknown, although *in vitro* studies in mammals suggest an inhibitory action on steroidogenic enzymes that is mediated by MT1 receptors located in the adrenal gland.

Our results point to the interrenal tissue of teleosts as a possible target on which melatonin, through specific receptors, can exert its reducing function of plasma cortisol levels.

III.1. OBJETIVO.

Los siguientes diseños experimentales pretenden profundizar en el efecto reductor del cortisol circulante producido por la MEL, descrito en el capítulo anterior, investigando las posibles acciones directas de la neurohormona a distintos niveles del eje HPI.

III.2. EFFECTO DE LA ACTH SOBRE INDICADORES DE RESPUESTA A ESTRÉS.

III.2.1. DISEÑOS EXPERIMENTALES.

En primer lugar, a fin de disponer de un modelo experimental en el que investigar la acción anti-estrés de la MEL, intentamos reproducir la activación del eje HPI mediante la administración de ACTH. Para ello realizamos un estudio inicial administrando ACTH porcina por vía IP a 2 dosis diferentes, 50 y 200 ng/g pc, y evaluando algunos parámetros plasmáticos de respuesta primaria y secundaria a estrés.

Los carpines ($29,8 \pm 1,1$ g) se mantuvieron en acuarios individuales desde 24 horas antes de las inyecciones hasta 24 horas después. Se utilizaron 3 grupos experimentales (n=4/grupo):

- Control: inyectado IP con solución salina (10 µl/g pc).
- ACTH (50 ng/g pc): inyectado IP con una solución de ACTH (50 ng/g pc).
- ACTH (200 ng/g pc): inyectado IP con una solución de ACTH (200 ng/g pc).

Inmediatamente antes de la inyección (t=0) y 30, 120 y 240 min después se extrajeron muestras de sangre para cuantificar los niveles de cortisol, glucosa y lactato en plasma.

En segundo lugar, se estudió el posible efecto que esta administración de ACTH puede producir en la ingestión de alimento, y del que no se tienen datos previos en peces. En base a los resultados obtenidos en el estudio anterior se decidió utilizar la dosis de ACTH de 50 ng/g. Los carpines ($26,3 \pm 0,8$ g) se dividieron en 2 grupos experimentales (n=8/grupo):

- Control: inyectado IP con solución salina (10 µl/g pc).
- ACTH (50 ng/g pc): inyectado IP con una solución de ACTH (50 ng/g pc).

Las inyecciones IP se realizaron en 2 condiciones de alimentación diferentes:

- Peces alimentados 30 min antes de la inyección con el 1% pc y, por tanto, se consideran “saciados”.
- Peces inyectados en condiciones de ayuno de 24 horas, es decir, recibieron la última ración de alimento 24 horas antes de la inyección.

A los 120 min de las inyecciones se cuantificó la ingesta y se extrajeron muestras de sangre para determinar los niveles de cortisol plasmático (apartado

2.5.6.2. de la sección de Materiales y métodos). La actividad locomotora se registró en todos los grupos durante 2 ciclos de 24 horas, uno anterior y otro posterior a la inyección.

III.2.2. RESULTADOS.

La Figura 3.1 muestra los efectos de la administración IP aguda de ACTH a dos dosis diferentes, 50 y 200 ng/g, en los niveles plasmáticos de cortisol, glucosa y lactato. El cortisol circulante no se modifica a lo largo del tiempo de estudio en los peces controles. Ambas dosis de ACTH incrementan los niveles de cortisol respecto a los valores encontrados a $t=0$, estando ya significativamente elevados a los 30 min de la inyección de 200 ng/g ($p<0,05$) y alcanzando el valor máximo de estimulación a los 120 min para ambas dosis ($p<0,05$ con ACTH 200 ng/g; $p<0,01$ con ACTH 50 ng/g), para recuperar los niveles basales tras 240 min (Figura 3.1a). A los 120 min de la administración de ACTH los niveles de cortisol circulante son significativamente mayores en los peces inyectados con la hormona ($p<0,05$ con ACTH 200 ng/g; $p<0,01$ con ACTH 50 ng/g) que en los controles. La glucemia aumentó significativamente a lo largo del tiempo de estudio (hasta 240 min) en todos los grupos de forma muy similar, no existiendo diferencias significativas entre los carpines tratados con ACTH y los controles (Figura 3.1b). Los niveles plasmáticos de lactato permanecieron estables durante el periodo de estudio (240 min), no existiendo tampoco diferencias significativas entre los diferentes grupos experimentales (Figura 3.1c).

La administración IP de ACTH no modifica los valores de actividad locomotora en las 24 horas posteriores a las inyecciones respecto a las 24 horas anteriores, a ninguna de las 2 dosis ensayadas (control: $83,1 \pm 10,5\%$; ACTH 50 ng/g: $66,6 \pm 7,8\%$; ACTH 200 ng/g: $72,6 \pm 13,3\%$).

Los resultados obtenidos del estudio del efecto de la administración IP de ACTH sobre la ingesta en el carpín aparecen resumidos en la Figura 3.2. La inyección de ACTH (50 ng/g) en ambos grupos de peces, saciados y en ayuno de 24 horas, incrementó significativamente los niveles circulantes de cortisol a los 120 min post-inyección ($p<0,05$ en peces saciados; $p<0,001$ en peces ayunados durante 24 horas), sin modificaciones significativas de la ingestión de alimento en ninguna de las condiciones de alimentación consideradas.

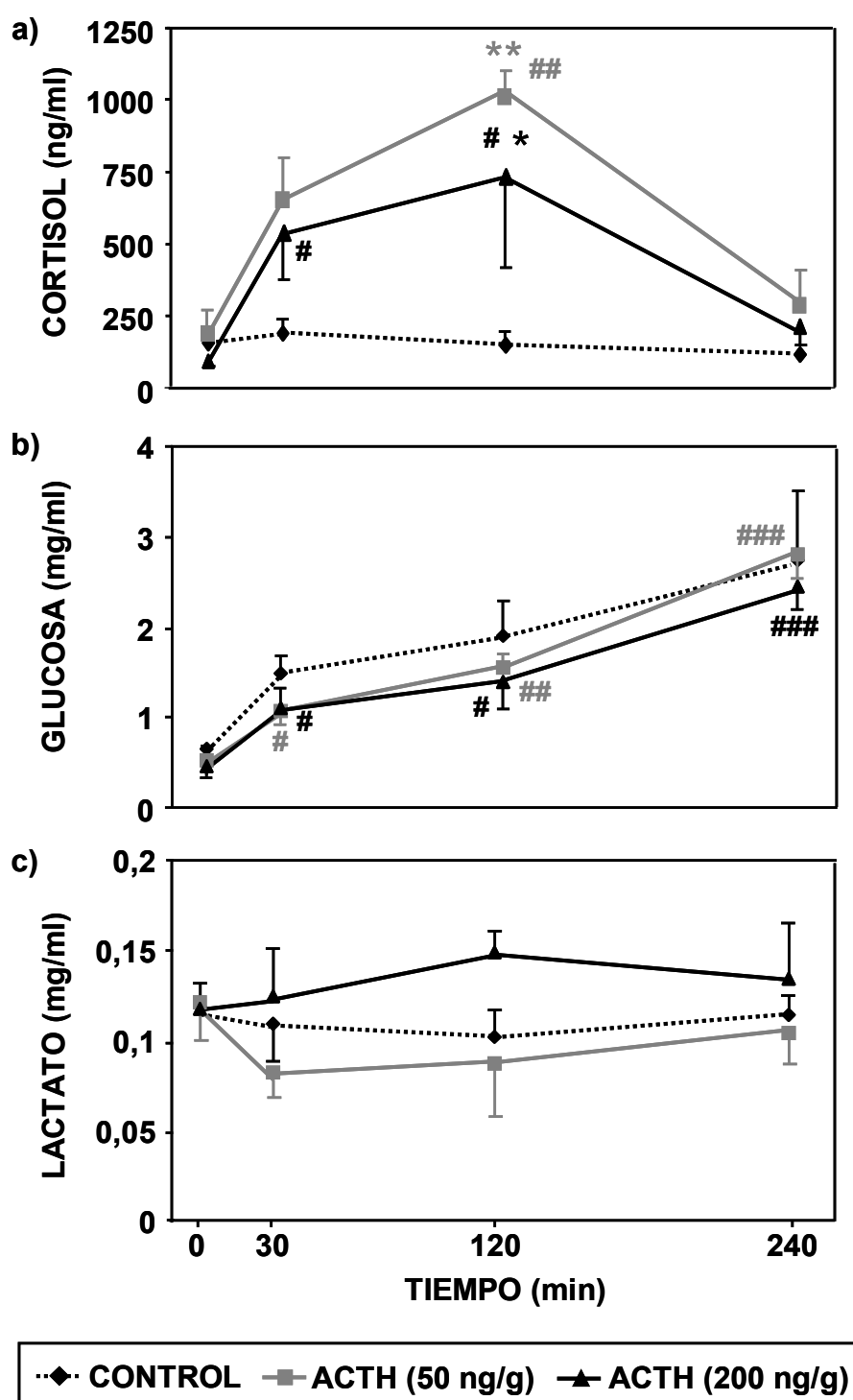


Figura 3.1. Niveles plasmáticos de **a)** cortisol, **b)** glucosa y **c)** lactato a los 0, 30, 120 y 240 min posteriores a la inyección IP de solución salina (control) o ACTH (50 y 200 ng/g) en el carpín. Los datos se expresan como la media \pm e.e.m. (n=4/grupo). #: $p < 0,05$; ##: $p < 0,01$; ###: $p < 0,001$, respecto al mismo grupo experimental a $t=0$; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$, respecto al grupo control en el mismo tiempo.

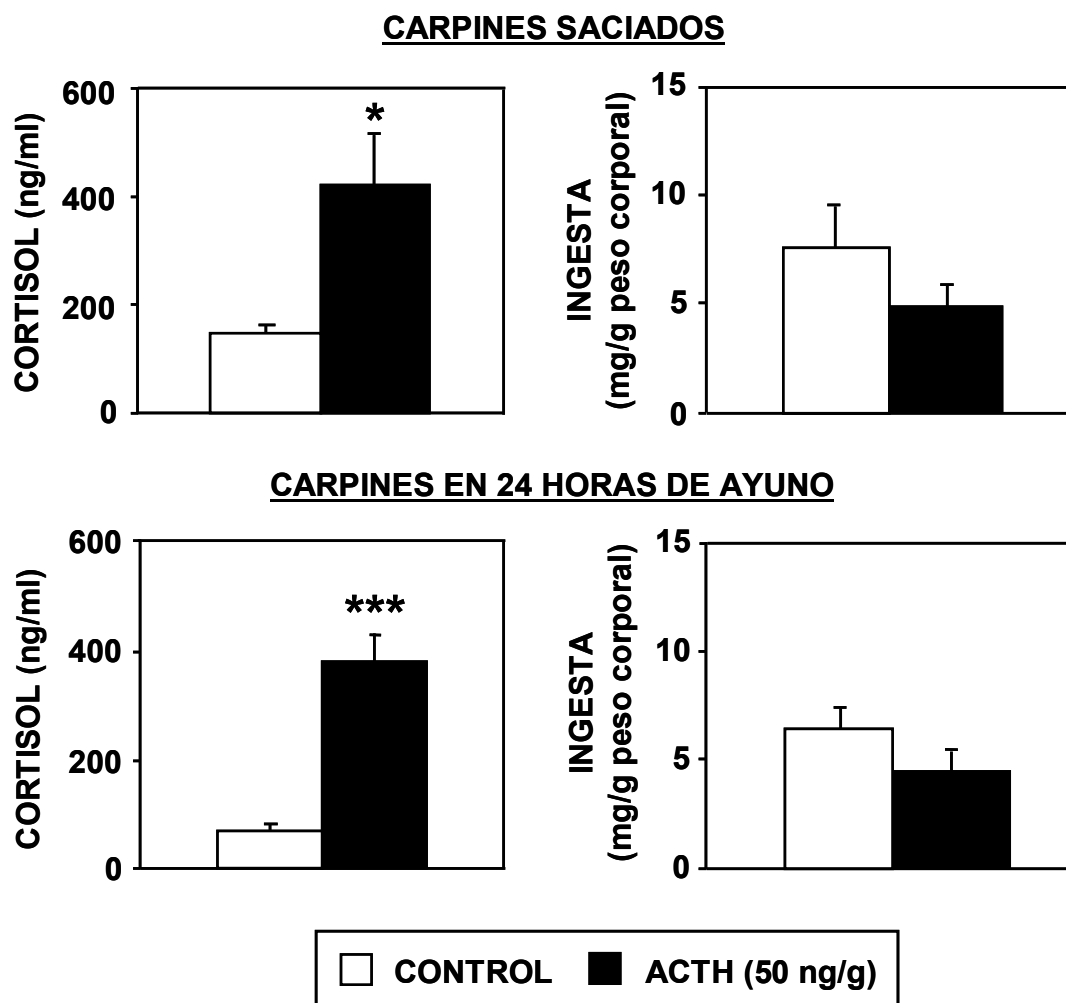


Figura 3.2. Efecto de la inyección IP de ACTH (50 ng/g) en los niveles plasmáticos de cortisol y la ingesta en carpines saciados y en ayuno durante 24 h, a los 120 min de las inyecciones. Los datos se expresan como la media \pm e.e.m. (n=8/grupo). *: $p < 0,05$; ***: $p < 0,001$, respecto al grupo control.

III.3. EFECTO DE LA MELATONINA EN EL INCREMENTO DE CORTISOL PLASMÁTICO INDUCIDO POR LA ACTIVACIÓN DEL EJE HPI CON CRF O ACTH.

III.3.1. DISEÑOS EXPERIMENTALES.

Se realizaron dos diseños con carpines en acuarios individuales de 5 l desde 24 horas antes de las inyecciones hasta 24 horas después.

En el primer diseño, los peces ($10,06 \pm 0,5$ g) se dividieron en 4 grupos (n=8/grupo) y recibieron dos inyecciones consecutivas, según el esquema mostrado a continuación:

GRUPOS	1ª inyección (IP) (10 µl/g pc)	2ª inyección (ICV) (1 µl)
CONTROL	solución salina	solución salina
MEL	MEL (20 µg/g pc)	solución salina
CRF	solución salina	CRF (1 µg/µl)
MEL + CRF	MEL (20 µg/g pc)	CRF (1 µg/µl)

La cantidad de CRF a inyectar se determinó previamente ensayando el efecto de dos concentraciones distintas (1 y 2,5 µg/µl) elegidas en base a estudios previos en el carpín (De Pedro *et al.*, 1997). Ambas concentraciones produjeron un aumento similar en los niveles de cortisol plasmático, por lo que se decidió utilizar 1 µg/µl.

En el segundo diseño, los carpines (30,25 ± 0,97 g) se dividieron en 4 grupos experimentales (n=8/grupo) y recibieron dos inyecciones IP consecutivas (separadas por un intervalo de 30 min), según el siguiente esquema:

GRUPOS	1ª inyección IP (5 µl/g pc)	2ª inyección IP (5 µl/g pc)
CONTROL	solución salina	solución salina
MEL	MEL (20 µg/g pc)	solución salina
ACTH	solución salina	ACTH (50 ng/g pc)
MEL + ACTH	MEL (20 µg/g pc)	ACTH (50 ng/g pc)

La dosis de ACTH se determinó en base a los resultados del apartado III.2 del presente capítulo. En ambos diseños se extrajeron muestras de sangre inmediatamente antes de las inyecciones (t=0) y 120 min después de las mismas para cuantificar los niveles de cortisol en plasma (apartado 2.5.6.2. de la sección de Materiales y métodos).

III.3.2. RESULTADOS.

La Figura 3.3 muestra el efecto de una inyección IP de MEL en el incremento del cortisol inducido por la administración de CRF o de ACTH en el carpín. El protocolo experimental utilizado no genera una situación de estrés por sí mismo, ya que el cortisol circulante en los peces del grupo control es similar a t=0 y a los 120 min de las inyecciones. Por otro lado, como cabe esperar, tanto la administración de CRF como de ACTH incrementan la producción de cortisol como resultado de la activación del eje HPI. El incremento producido por la inyección ICV de CRF (Figura 3.3a) duplica los valores de cortisol respecto al grupo control a los 120 min ($p<0,001$) y respecto a sus propios niveles a t=0 ($p<0,005$). La inyección de MEL previa a la inyección de CRF no modifica este incremento, manteniéndose las diferencias significativas tanto respecto

al grupo control ($p<0,001$) como respecto a sus propios niveles a $t=0$ ($p<0,01$). La inyección IP de ACTH (50 ng/g) resulta muy efectiva en la estimulación de la producción de cortisol, ya que incrementa la hormona circulante en torno a 5 veces, tanto respecto a los niveles del mismo grupo a $t=0$ ($p<0,05$) como respecto a los medidos en los peces controles a los 120 min de las inyecciones ($p<0,01$, Figura 3.3b). Esta estimulación por ACTH no se modifica con la administración previa de MEL (20 $\mu\text{g/g}$), que tampoco modifica por sí sola los niveles basales de cortisol en ninguno de los dos experimentos realizados.

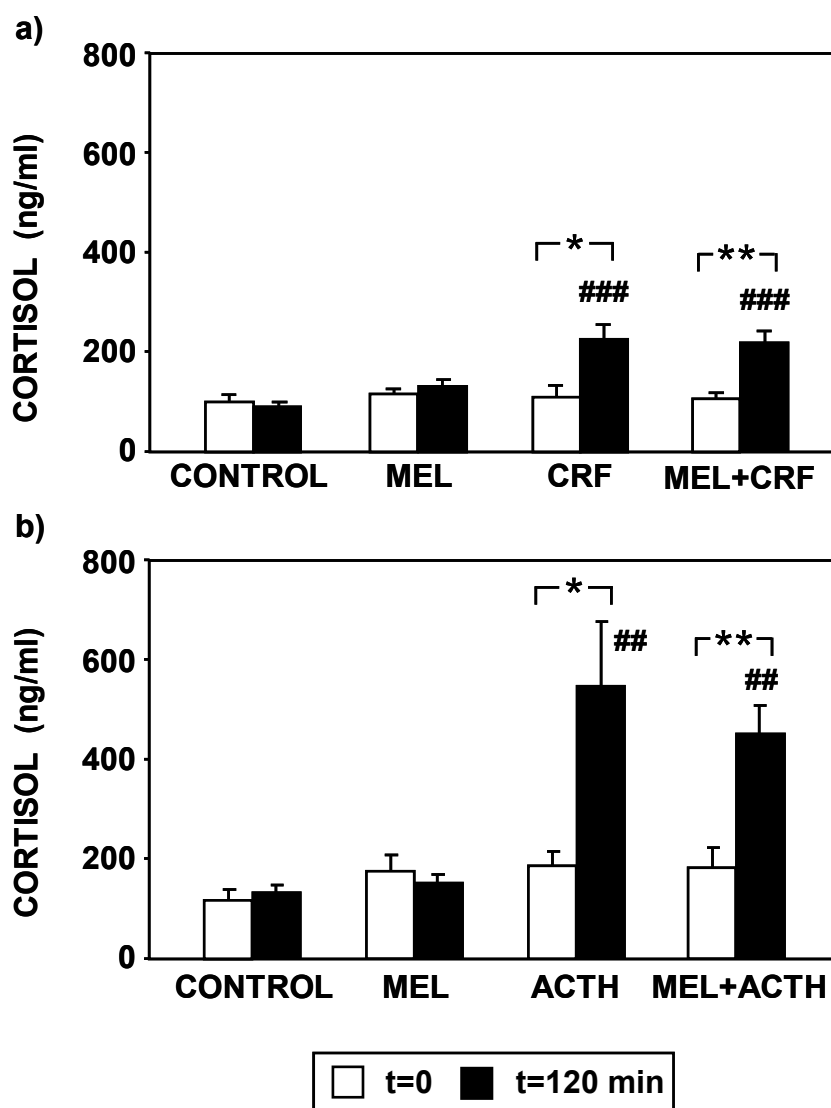


Figura 3.3. Niveles plasmáticos de cortisol inmediatamente antes ($t=0$) y 120 min después de la administración IP de melatonina (MEL, 20 $\mu\text{g/g}$) en carpines inyectados con **a)** CRF (ICV, 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) o **b)** ACTH (IP, 50 ng/g). Los datos se expresan como la media \pm e.e.m. ($n=8/\text{grupo}$). ##: $p<0,01$; ###: $p<0,001$, respecto al grupo control a los 120 min; *: $p<0,05$; **: $p<0,01$.

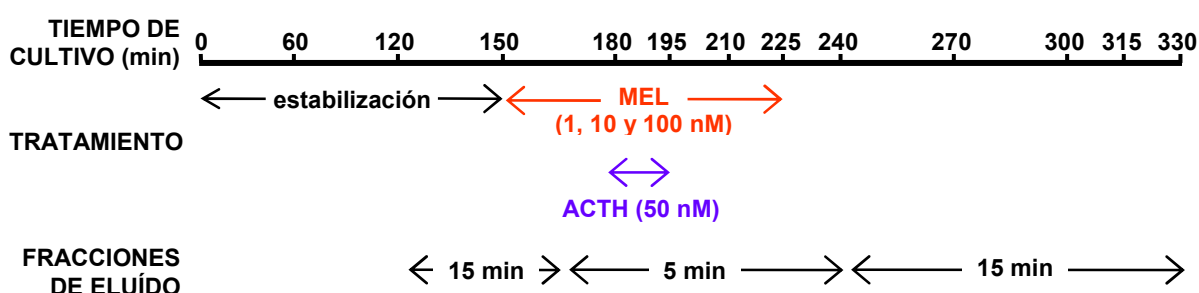
III.4. EFECTO DIRECTO DE LA MELATONINA EN EL TEJIDO INTERRENAL. APROXIMACIONES *IN VITRO*.

III.4.1. DISEÑOS EXPERIMENTALES.

a) Ensayos en *Carassius auratus*.

Para realizar este estudio se utilizaron carpines de $35,8 \pm 1,7$ g, y se siguió el protocolo de cultivo en superfusión para tejido interrenal desarrollado por el laboratorio de Fisiología Animal de la *Radboud University* (Nijmegen, Holanda) dirigido por el Dr. Gert Flik, y descrito detalladamente en el apartado 2.4.1 de la sección de Materiales y métodos de la presente Memoria. Esta parte del estudio se realizó en dicho laboratorio con el apoyo de una ayuda predoctoral para estancias breves concedida por el MICINN.

El diseño experimental empleado se resume en el siguiente esquema:



Esquema 3.1. Tratamientos y secuencia temporal del cultivo en superfusión del tejido interrenal de carpín.

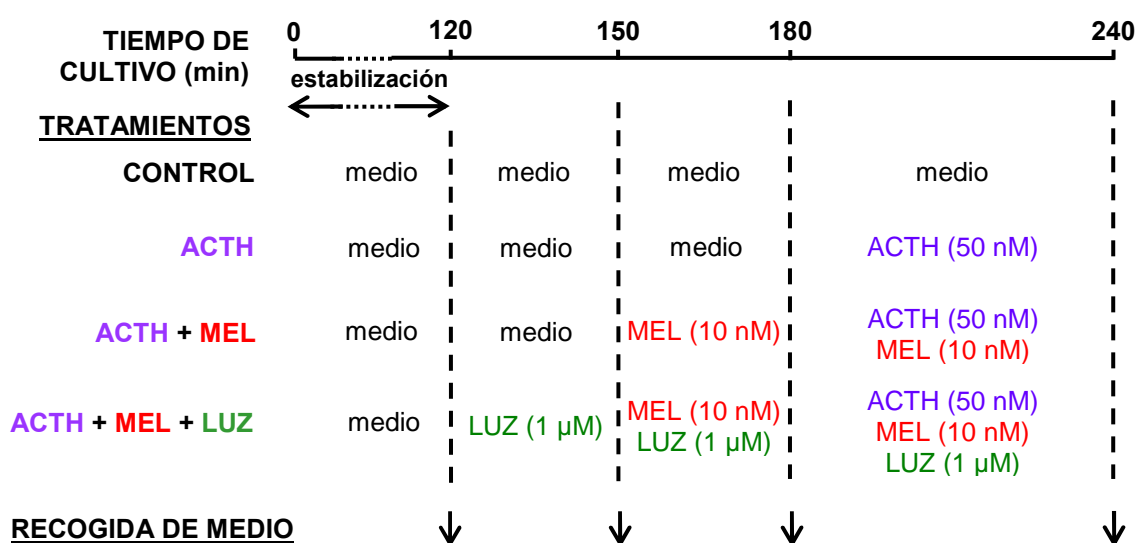
En primer lugar se realizó una curva concentración-respuesta de ACTH humana (1-100 nM), en la que tras un periodo de estabilización (0-150 min) se estimuló el tejido interrenal con la hormona durante 15 min (180-195 min), ensayando cada una de las concentraciones de ACTH en los fragmentos de tejido. Establecida la concentración óptima de ACTH en 50 nM, se procedió a incubar el tejido en presencia de diferentes concentraciones de MEL (1, 10 y 100 nM), considerando los siguientes grupos experimentales:

- ACTH (50 nM): incubado con ACTH (50 nM) durante 15 min (180-195 min).
- MEL (1 nM) + ACTH: incubado con MEL (1 nM, 150-225 min) y ACTH (50 nM, 180-195 min).
- MEL (10 nM) + ACTH: incubado con MEL (10 nM, 150-225 min) y ACTH (50 nM, 180-195 min).
- MEL (100 nM) + ACTH: incubado con MEL (100 nM, 150-225 min) y ACTH (50 nM, 180-195 min).

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las fracciones de medio de cultivo eluído de las cámaras se recogieron en intervalos de 5 min (165-240 min) y 15 min (120-165 min y 240-330 min) para la posterior cuantificación del contenido de cortisol liberado por el tejido interrenal (apartado 2.5.6.1.b de la sección de Materiales y métodos).

Con la información obtenida a partir del cultivo en superfusión, y a fin de estudiar la especificidad del efecto de la MEL, se realizaron cultivos de tejido interrenal en un sistema estático (descrito en el apartado 2.4.2 de la sección de Materiales y métodos). Esta parte del estudio se realizó con carpines de $67,5 \pm 2,3$ g en nuestro laboratorio de la Facultad de Biología de la Universidad Complutense de Madrid, considerando los siguientes tratamientos (n=8-12/grupo):

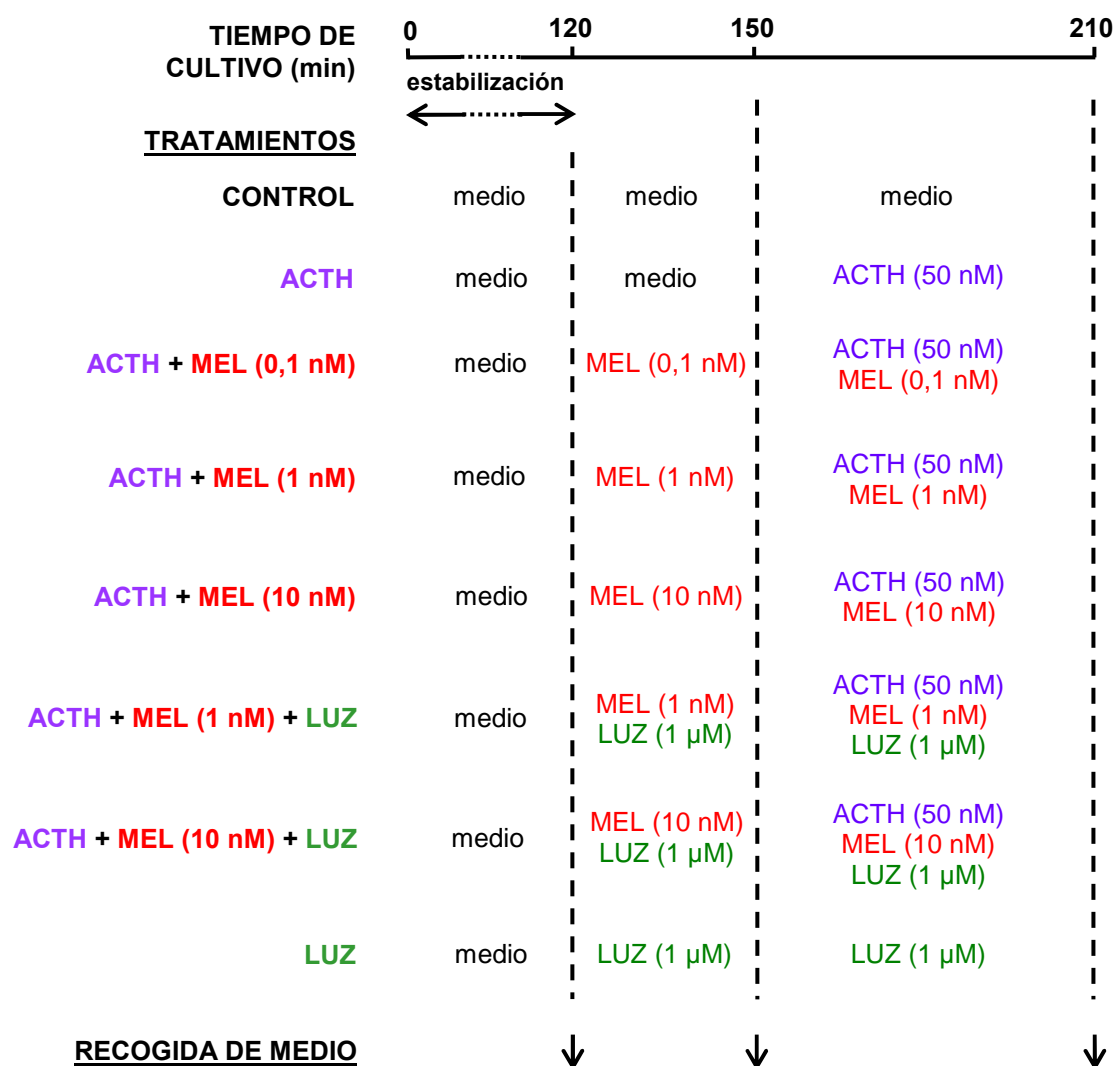


Esquema 3.2. Grupos experimentales, tratamientos y secuencia temporal del cultivo estático del tejido interrenal de carpín (LUZ: luzindol).

Al final del periodo de estabilización (t=120 min) y de los intervalos 120-150, 150-180 y 180-240 min, se recogió el medio de cultivo para la posterior cuantificación del contenido de cortisol liberado por el tejido interrenal (apartado 2.5.6.2. de la sección de Materiales y métodos).

b) Ensayos en *Oncorhynchus mykiss*.

Este estudio se realizó con ejemplares de trucha arco iris ($448,08 \pm 25,49$ g) utilizando los tratamientos indicados en el Esquema 3.3 (n=8-12/grupo):



Esquema 3.3. Grupos experimentales, tratamientos y secuencia temporal del cultivo estático del tejido interrenal de trucha arco iris.

El medio de cultivo fue recogido tras el periodo de estabilización y al finalizar los intervalos de 120-150 min y 150-210 min, para la posterior cuantificación del contenido de cortisol liberado por el tejido interrenal (apartado 2.5.6.2. de la sección de Materiales y métodos).

III.4.2. RESULTADOS.

a) Ensayos en *Carassius auratus*.

Los perfiles de cortisol liberado por tejido interrenal de carpín incubado en un sistema en superfusión, en presencia de ACTH sola o con distintas concentraciones de MEL se muestran en la Figura 3.4. Un análisis cuantitativo del posible efecto de la MEL sobre la liberación basal (120-150 min) y estimulada de cortisol se representa en las Figuras 3.5a y 3.5b, respectivamente. La adición de ACTH (50 nM; 180-195 min) al medio de cultivo estimula la liberación de cortisol a los 15 min de la adición de la

hormona, alcanzando el máximo de liberación de cortisol (345% respecto a la basal) a los 45 min (Figura 3.4a). La presencia previa de MEL en el medio de cultivo (150-180 min), anterior a la estimulación con ACTH, parece producir un descenso de la liberación basal de cortisol (Figuras 3.4b y 3.4c), que no resulta ser estadísticamente significativo (Figura 3.5a). Sin embargo, la MEL (1 y 10 nM) modifica la estimulación inducida por ACTH, reduciendo la cantidad total de cortisol liberado en el intervalo 150-300 min ($p < 0,05$, Figura 3.5b).

Los resultados muestran que el momento de máxima liberación de cortisol es similar en los 4 grupos experimentales (en torno al minuto 225), y tampoco se observan diferencias entre grupos en la cantidad total de cortisol liberado en los 30 min anteriores y en los 30 posteriores a dicho momento de máxima liberación. Sin embargo, la recuperación de los niveles basales de cortisol tras la estimulación con ACTH se alcanza antes en los tejidos tratados con MEL (1 y 10 nM, 240 y 255 min, respectivamente) que en los incubados sólo con ACTH (300 min) (Figura 3.4).

En la Figura 3.6 se analizan los efectos de la ACTH y la MEL en la producción de cortisol agrupando los datos en intervalos de 30 min. La adición de ACTH, como cabe esperar, incrementa significativamente la liberación de cortisol en el intervalo 180-300 min respecto a la liberación pre-estimulación (150-180 min) ($p < 0,001$). La presencia de MEL en el medio reduce este efecto estimulador desde el minuto 210, encontrando diferencias en función de la concentración de MEL utilizada. Así, el efecto de la menor concentración (1 nM) se prolonga durante 90 min, el de la concentración intermedia (10 nM) durante 60 min y la concentración más alta sólo produce reversión de la estimulación por ACTH en el intervalo 210-240 min ($p < 0,05$; Figura 3.6).

Los resultados obtenidos en el cultivo estático del tejido interrenal de carpín se presentan en la Figura 3.7. La presencia de ACTH durante 1 hora en el medio de cultivo aumenta la liberación de cortisol 3 veces respecto a la liberación basal ($p < 0,001$), siendo este incremento de un orden de magnitud similar al encontrado en los cultivos en superfusión realizados con tejido interrenal de esta misma especie (Figura 3.4). La adición de MEL a la concentración de 10 nM reduce de forma parcial, pero significativa ($p < 0,05$), la liberación de cortisol estimulada con ACTH, aunque no se llegan a alcanzar los valores de producción basal encontrados en el grupo control sin estimulación. La preincubación con luzindol (LUZ, 1 μ M), antagonista general de los receptores de MEL, revierte esta reducción inducida por la neurohormona, recuperándose los valores de cortisol obtenidos con la estimulación por ACTH. El LUZ, por sí solo, no modifica significativamente la liberación de cortisol por el tejido interrenal (datos no mostrados).

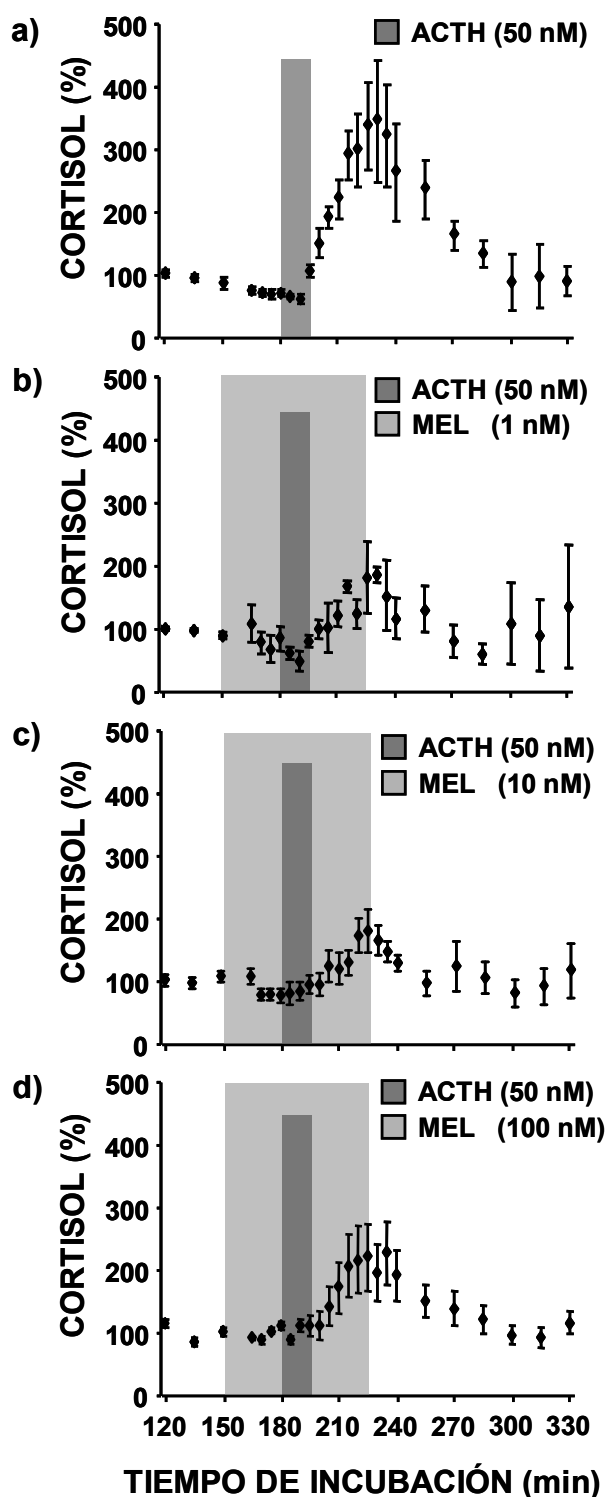


Figura 3.4. Perfiles de cortisol liberado por el tejido interrenal de carpín en un sistema de cultivo en superfusión tras la incubación con ACTH (50 nM) **a)** únicamente, y conteniendo melatonina (MEL) a las concentraciones de **b)** 1 nM, **c)** 10 nM y **d)** 100 nM. Los datos representan el porcentaje de liberación de cortisol en cada intervalo de tiempo respecto a la producción media basal (intervalo 120-150 min), y se expresan como la media \pm e.e.m. (n=3-8/grupo).

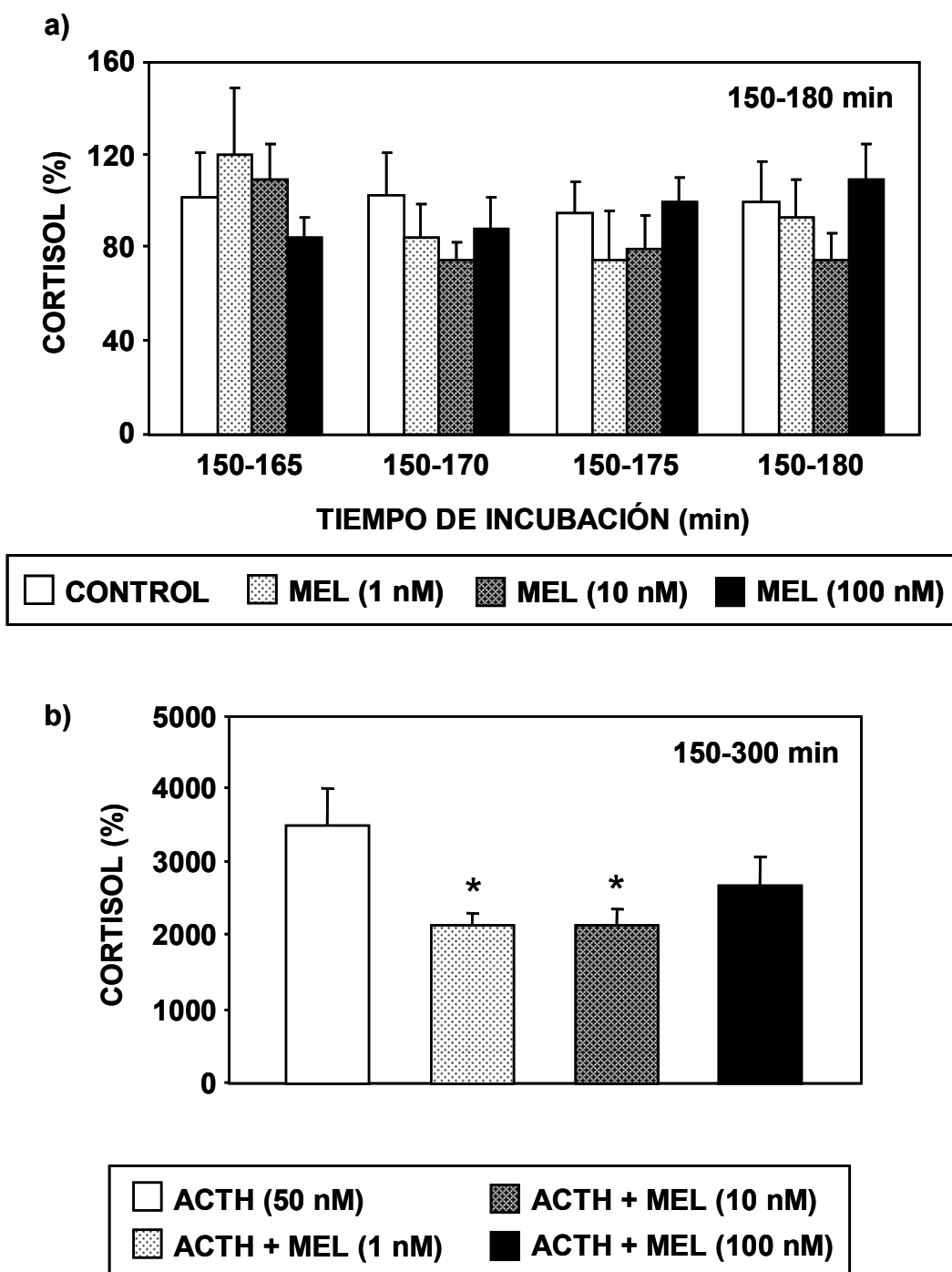


Figura 3.5. Cortisol liberado por el tejido interrenal de carpín en un sistema de cultivo en superfusión. **a)** Liberación basal durante la incubación con medio de cultivo solo (control) o conteniendo distintas concentraciones de melatonina (MEL, 1, 10 y 100 nM) en el intervalo 150-180 min. Los datos representan el promedio del porcentaje de liberación en cada intervalo temporal respecto al cortisol liberado al final del periodo de estabilización previo (150 min). **b)** Liberación total durante la incubación con ACTH (50 nM) sola o en presencia de MEL (1, 10 y 100 nM) en el intervalo 150-300 min. Los datos representan la suma del porcentaje de liberación en cada intervalo temporal respecto al cortisol liberado durante el periodo de estabilización previo (120-150 min). Todos los datos se expresan como la media \pm e.e.m. ($n=3-8$ /grupo). *: $p<0,05$, respecto al grupo tratado con ACTH.

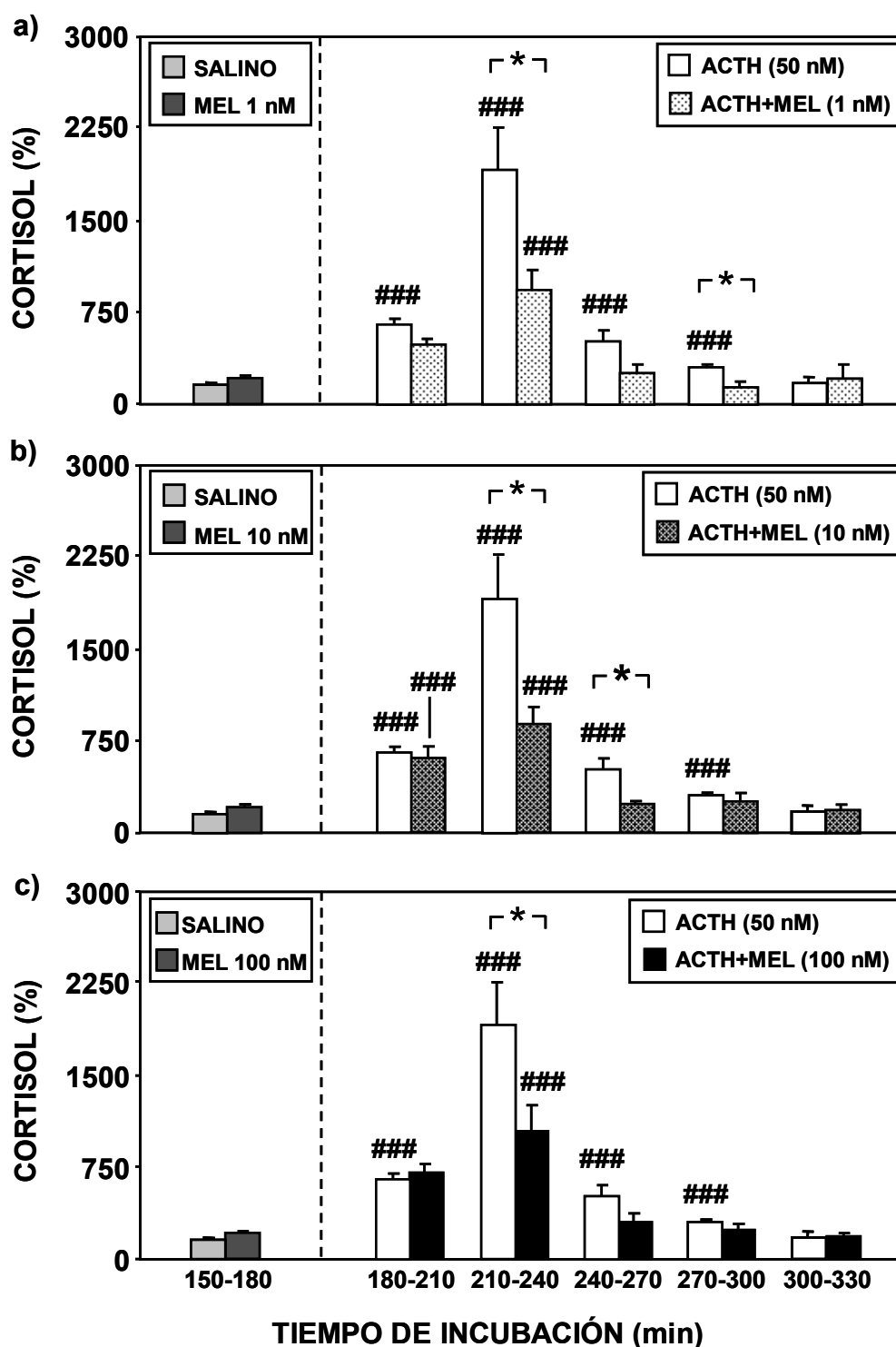


Figura 3.6. Cortisol liberado por el tejido interrenal de carpín, representado en intervalos de 30 min, en un sistema de cultivo en superfusión. El tejido fue incubado con ACTH (50 nM) sola o en presencia de melatonina (MEL) **a)** 1 nM, **b)** 10 nM y **c)** 100 nM. Los datos representan la suma del porcentaje de liberación de cortisol en cada intervalo de tiempo respecto a la producción media basal (intervalo 120-150 min) y se expresan como la media \pm e.e.m. ($n=3-8$ /grupo). ###: $p < 0,001$, respecto a los niveles basales del mismo grupo experimental; *: $p < 0,05$.

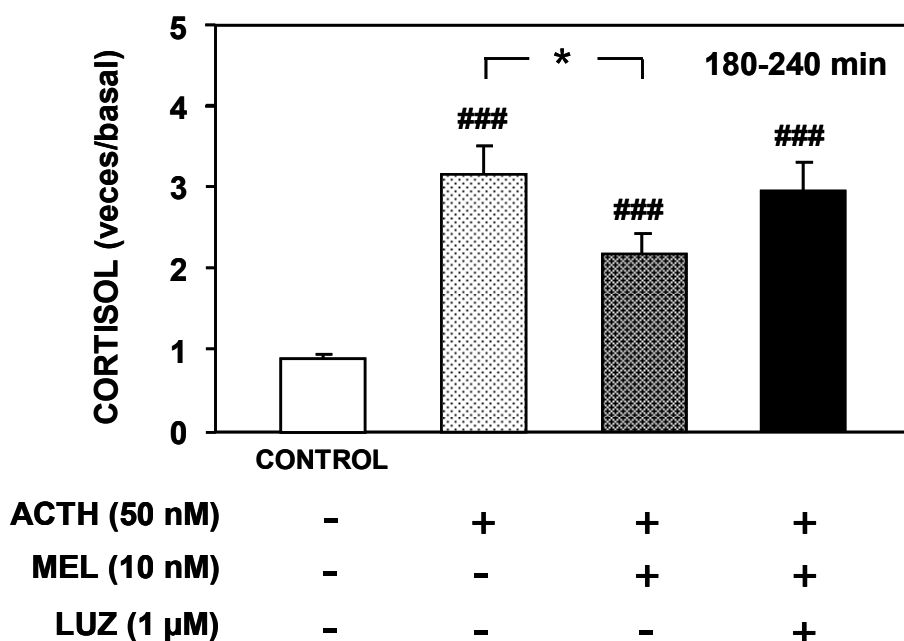


Figura 3.7. Cortisol liberado por el tejido interrenal de carpín en un sistema de cultivo estático en presencia de ACTH (50 nM), ACTH+melatonina (MEL, 10 nM) y ACTH+MEL+luzindol (LUZ, 1 µM) en el intervalo 180-240 min. Los datos representan el incremento de liberación de cortisol respecto al cortisol liberado durante el periodo de estabilización (60-120 min), y se expresan como la media \pm e.e.m. (n=8-12/grupo). ###: $p < 0,001$, respecto al grupo control; *: $p < 0,05$.

b) Ensayos en *Oncorhynchus mykiss*.

Los resultados obtenidos en los cultivos estáticos realizados con el tejido interrenal de la trucha se representan en la Figura 3.8, en condiciones basales (Figura 3.8a) y tras la estimulación con ACTH (Figura 3.8b). La adición de MEL a las concentraciones de 1 y 10 nM reduce la liberación basal de cortisol, siendo este efecto revertido en su totalidad por la presencia de LUZ (1 µM) en el medio de cultivo ($p < 0,05$ y $p < 0,01$, respectivamente) (Figura 3.8a). El LUZ por sí solo no modificó la liberación basal de cortisol. La incubación con ACTH (1,3 µM) aumentó significativamente (aproximadamente 4 veces) la liberación de cortisol al medio (Figura 3.8b) que se reduce de forma significativa con las tres concentraciones de MEL ensayadas ($p < 0,01$ para 0,1 y 1 nM; $p < 0,05$ para 10 nM). La presencia de LUZ (1 µM) en el medio de cultivo revierte de forma significativa ($p < 0,05$) la reducción observada tras la adición de MEL (10 nM), recuperándose los valores de cortisol similares a los encontrados en los tejidos cultivados únicamente con ACTH.

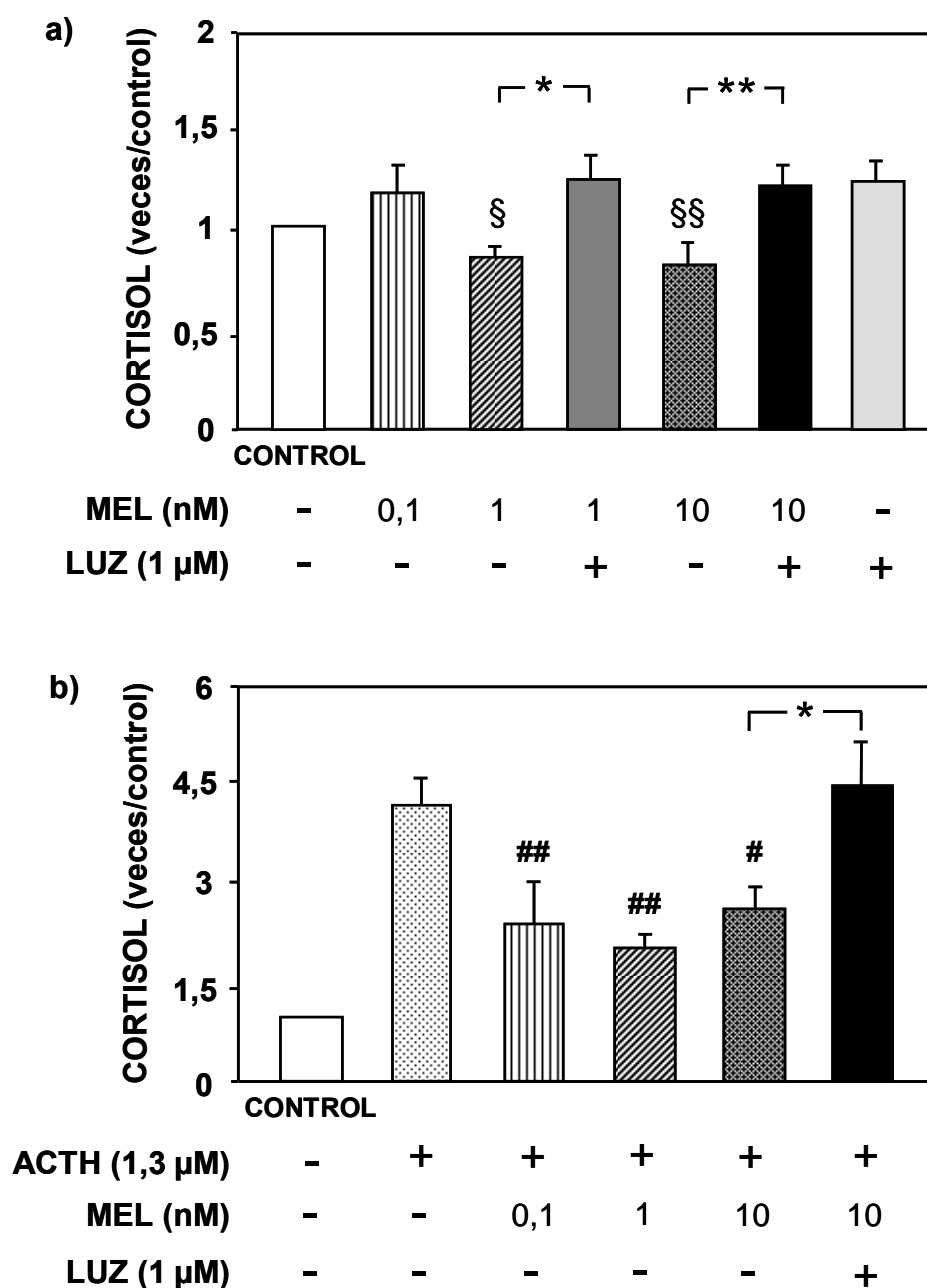


Figura 3.8. Cortisol liberado por el tejido interrenal de la trucha arco iris en un sistema de cultivo estático en presencia de melatonina (MEL; 0,1, 1 y 10 nM) y luzindol (LUZ, 1 µM) **a)** en condiciones basales (120-150 min) y **b)** de estimulación con ACTH (1,3 µM, 150-210 min). Los datos representan el incremento de liberación de cortisol en cada intervalo de tiempo respecto al grupo control, y se expresan como la media \pm e.e.m. (n=8-12/grupo). #: $p < 0,05$; ##: $p < 0,01$, respecto al grupo estimulado con ACTH sola; §: $p < 0,05$; §§: $p < 0,1$, respecto al grupo MEL 0,1 nM; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$.

III.5. DISCUSIÓN.

Los resultados obtenidos en la primera parte del presente capítulo nos permiten afirmar que las aproximaciones experimentales utilizadas constituyen un buen modelo de activación del eje HPI, ya que tanto la inyección de ACTH como de CRF incrementan el cortisol circulante a tiempos cortos. Además, la estabilidad en los niveles de cortisol que se observa en los peces control a lo largo del estudio confirma la ausencia de estrés asociado a la experimentación. Numerosos trabajos previos realizados en distintas clases de vertebrados han utilizado la administración de ACTH como método de simulación de exposición a una situación de estrés y para evaluar la funcionalidad del tejido adrenal *in vivo* e *in vitro* (Hontela, 1998; Belanger *et al.*, 2001; Rotllant *et al.*, 2003). El incremento del cortisol circulante observado en el carpín tras la administración de ACTH es similar al descrito en el esturión, en el que el cortisol aumenta desde los primeros minutos tras la administración de ACTH, recuperando los niveles basales a las 4 h (Belanger *et al.*, 2001). Asimismo, la magnitud de la máxima estimulación inducida por la ACTH en el carpín (aproximadamente 8 veces los niveles basales) también es similar a la observada en el esturión, pero independiente de la dosis empleada, por lo que cabe plantear que la menor de las dosis utilizadas en nuestro estudio (50 ng/g) es suficientemente elevada para saturar los receptores de ACTH del tejido interrenal del ciprínido.

Una diferencia adicional respecto a los resultados publicados en el esturión reside en el perfil temporal de estimulación, que en el carpín alcanza el máximo de cortisol circulante a los 120 min de la inyección de ACTH frente a una respuesta mucho más rápida en el esturión. Una posible justificación a este distinto perfil temporal es la diferente vía de administración de la hormona utilizada en ambos estudios, más rápida en el esturión (intravenosa) que en el carpín (intraperitoneal). No obstante, teniendo presentes los distintos umbrales de sensibilidad ante la exposición a situaciones de estrés en los peces (Pottinger, 2010; Ellis *et al.*, 2012), esta diferencia temporal apoya datos previos que indican una baja susceptibilidad del carpín a los agentes estresantes (Das, 1995), posiblemente derivada de su uso extensivo en acuariofilia desde hace siglos. En otra especie de cultivo, la trucha arco iris, se ha descrito un incremento de cortisol circulante a los 90 min de la administración intramuscular de ACTH en ejemplares sometidos a un protocolo de estrés agudo, no habiéndose cuantificado el posible efecto de la hormona a otros tiempos (Blom *et al.*, 2001).

En los diseños realizados en el presente estudio no se han encontrado modificaciones en los niveles de glucosa y lactato circulantes, por lo que podemos afirmar que la administración de ACTH ha generado una respuesta primaria al estrés.

Estos resultados confirman lo esperado, y concuerdan con resultados previos mostrados en el capítulo II (apartado 4) de esta Memoria, en el que un protocolo de estrés agudo por exposición al aire durante 1 min no altera la glucemia en un intervalo de hasta 120 min post-inyección. En cambio, un estrés agudo ligeramente más severo (5 min de manipulación, capítulo II, apartado 5) sí incrementa la glucosa y el lactato circulantes. Esta diferencia puede justificarse en base a los diferentes procedimientos experimentales utilizados. El protocolo de inyecciones previo al estrés producido por 5 min de manipulación puede estar induciendo una estimulación inicial del tono basal del eje HPI, de forma que la manipulación posterior desencadenaría una respuesta secundaria, con aumento de la glucosa y el lactato circulantes. Asimismo, como ya se ha discutido previamente en esta Memoria, no podemos ignorar que la glucemia es un parámetro que no depende únicamente de la activación del eje HPI (Pottinger y Carrick, 1999), sino también de otros reguladores, como las catecolaminas (Wendelaar Bonga, 1997), y que está fuertemente influida por otros factores como la dieta, el estado nutricional del animal, las estaciones y el fotoperiodo (Cerdá-Reverter *et al.*, 1998; Polakof *et al.*, 2012). Las variaciones en los niveles de lactato plasmático parecen depender del tipo de estrés aplicado y de su duración, aumentando especialmente en condiciones de hipoxia o con protocolos que impliquen una mayor actividad muscular (Barton e Iwama, 1991; Barton *et al.*, 1998; Arends *et al.*, 1999; Van der Salm *et al.*, 2006). En nuestro estudio, la activación del eje HPI no se asocia a ninguno de estos procedimientos, generando una respuesta primaria al estrés sin cambios comportamentales significativos, lo que justificaría la ausencia de variaciones en los niveles de lactato circulante. Además, al igual que sucede con la glucemia, los cambios en los niveles de lactato vienen determinados principalmente por otros factores, como las catecolaminas (Arends *et al.*, 1999).

Un resultado inesperado es el incremento de la glucemia observado de forma progresiva en todos los peces a lo largo de las 4 h de estudio. No disponemos de una explicación sencilla a este hallazgo, si bien podemos descartar que se deba a un hipotético estrés producido por la inevitable manipulación (muestreo, presencia de investigadores, etc.) durante las 4 h de experimentación, ya que los peces controles no modifican sus niveles de cortisol circulante durante todo el procedimiento. Cabría plantear la posible existencia de variaciones de la glucemia a lo largo del día, bien definidas en forma de ritmicidad diaria en otros vertebrados, principalmente mamíferos, pero no tan concluyentes en los peces. Algunos estudios muestran valores mayores de glucosa circulante durante la escotofase en el dentón común (*Dentex dentex*) (Pavlidis *et al.*, 1999), o al final del mismo periodo en la lubina (Cerdá-Reverter *et al.*, 1998), describiéndose también diferentes perfiles diarios en función de la época

del año en la carpa común (*Cyprinus carpio*) (Kühn *et al.*, 1986). En el carpín, Delahunty y colaboradores (1978) describen un incremento progresivo de la glucosa circulante entre el momento de la ingesta y las 3 horas posteriores, si bien la magnitud del mismo y su duración dependen de la estación del año. El hecho de que todos los grupos experimentales en el presente estudio muestren un aumento de la glucemia desde el momento habitual de administración del alimento hasta las 4 h posteriores apoyaría esta propuesta de una ritmicidad diaria en la glucemia asociada a la hora de la alimentación, que persiste en condiciones de 24 h de ayuno. La robustez del sistema circadiano en esta especie y la importancia de la hora de alimentación como *zeitgeber* (Feliciano *et al.*, 2011; Nisembaum *et al.*, 2012) refuerzan esta justificación.

Desde un punto de vista comportamental, también analizamos los posibles cambios inducidos por la ACTH en la actividad locomotora y la ingestión de alimento. El protocolo de administración aguda de ACTH no modifica significativamente la actividad locomotora mostrada por los peces durante las 24 h posteriores a la inyección, en comparación con la cuantificada durante las 24 h previas, que además resultó ser muy similar en los 3 grupos experimentales. Este resultado concuerda con el obtenido en el capítulo II de esta Tesis Doctoral, que utiliza un protocolo de estrés agudo de corta duración, no existiendo hasta la fecha otros estudios conocidos que analicen esta cuestión en los peces. Sin embargo, se ha descrito que la activación crónica del eje HPI produce alteraciones comportamentales en algunos peces, como en varias especies de salmónidos, que muestran un comportamiento de subordinación social ante la exposición a niveles crónicamente elevados de cortisol (Noakes y Leatherland, 1977; Ejike y Schreck, 1980). Por tanto, sugerimos que una activación aguda del eje HPI, como la generada en nuestro estudio, no se traduce en alteraciones de la actividad locomotora general, al menos en el carpín, y podría ser necesaria una exposición crónica a niveles elevados de cortisol para observar cambios comportamentales significativos.

En relación con la ingesta, la administración IP de una dosis aguda de ACTH no altera el comportamiento alimentario a tiempos cortos en el carpín, independientemente del tiempo transcurrido desde la última comida. Teniendo en cuenta que la exposición al estrés reduce la ingesta en los peces (Carr, 2002; Liebert y Schreck, 2006; Rubio *et al.*, 2010), nuestros resultados no apoyan a la ACTH como mediadora de este efecto anorético asociado a la activación del eje HPI, siendo el CRF hipotalámico, potente agente anorexigénico en el carpín (De Pedro *et al.*, 1997; Bernier, 2006), un candidato idóneo para realizar esta acción. A pesar de los numerosos estudios dirigidos a caracterizar los agentes neuroendocrinos reguladores de la ingestión de alimento en teleósteos (De Pedro y Björnsson, 2001; Volkoff *et al.*,

2009), este es el primer trabajo (al menos en la bibliografía consultada) que analiza el posible efecto de la ACTH. En otros vertebrados apenas existen estudios que investiguen el efecto de la ACTH sobre la ingesta, a diferencia de los numerosos trabajos realizados con otros péptidos también derivados de la POMC (Millington *et al.*, 2007), habiéndose publicado resultados muy variables dependiendo de factores como la especie, la dosis inyectada o el estado nutricional de los animales (Coll *et al.*, 2006; Virden *et al.*, 2007; Schulz *et al.*, 2010).

En el capítulo II de la presente Tesis Doctoral se demuestra que la MEL revierte las respuestas *in vivo* inducidas por la exposición a un protocolo de estrés agudo en el carpín, sugiriendo que esta hormona podría desempeñar un papel anti-estrés en esta especie. Sin embargo, se desconocen los mecanismos por los que la MEL podría realizar este efecto, y las posibles dianas del eje HPI sobre las que potencialmente podría estar actuando. A fin de investigar esta cuestión utilizamos dos modelos experimentales de activación del eje HPI sobre los que ensayar los posibles efectos de la MEL. En ambos diseños (inyección ICV de CRF e IP de ACTH) se incrementan de forma muy significativa los niveles plasmáticos de cortisol, lo que equivale a una respuesta primaria ante una situación de estrés. Sin embargo, los resultados obtenidos en estos modelos de activación suprafisiológica del eje HPI no apoyan un efecto significativo de la MEL sobre la producción de cortisol *in vivo*.

Estudios clásicos proponen que la glándula pineal participa en la regulación del eje HPA, y que la MEL influye en la sensibilidad de los componentes neuroendocrinos que controlan el funcionamiento del mismo, contrarrestando algunas respuestas endocrinas, comportamentales e inmunológicas a la exposición al estrés (Pierpaoli y Maestroni, 1987; Konakchieva *et al.*, 1997). Estudios pioneros mostraron que la pinealectomía produce hipertrofia adrenal e incrementos de la corticosterona circulante en roedores (Kinson *et al.*, 1968; Vaughan *et al.*, 1972; Ogle y Kitay, 1976), mientras que un tratamiento crónico con MEL atenuaba la respuesta adrenocortical al estrés en la rata (Konakchieva *et al.*, 1997, 1998). En otras clases de vertebrados, como los reptiles, la pinealectomía produce hipertrofia y la MEL atrofia de la corteza adrenal, en base a los cambios de peso y volumen de este órgano (Haldar y Taphliyal, 1979). En los peces, los primeros estudios realizados en busca de una relación entre la glándula pineal y la interrenal se publicaron en 1989 por Agha y Joy en el pez gato, donde la pinealectomía producía hipertrofia de las células adrenocorticales e incrementaba el cortisol en plasma, y por Peter (1968) que no encontró modificaciones del diámetro nuclear de las células interrenales del carpín. Tras estos estudios, durante más de 30 años no se publicaron trabajos en peces que relacionasen la MEL con el eje adrenal,

hasta la primera década del siglo XXI, en que se demostró una reducción de los niveles basales de cortisol en la lubina producida por la administración crónica de la neurohormona (Herrero *et al.*, 2007). En el carpín, la administración aguda de MEL revierte el incremento en los niveles plasmáticos de cortisol tras la exposición a una situación de estrés (capítulo II) y, a primera vista, podría pensarse que los presentes resultados lo contradicen; sin embargo, las diferentes aproximaciones experimentales utilizadas en ambos diseños pueden justificar esta aparente discrepancia. Así, el incremento de CRF y ACTH inducido por la administración exógena de estos péptidos puede ser muy superior al producido por la exposición a un protocolo de estrés agudo, como el utilizado en el capítulo II, pudiendo enmascarar la reversión por la MEL. También es posible hipotetizar que la acción anti-estrés de la MEL se ejerza a nivel hipotalámico, inhibiendo las células productoras de CRF, por lo que sería inefectiva en una situación de activación exógena del eje con el propio péptido. A favor de esta propuesta se ha publicado un efecto directo de la MEL en la expresión génica de *crf* en células de Leydig de hámster (Frungeri *et al.*, 2005).

A pesar de las evidencias de una acción directa de la MEL en la glándula adrenal de los mamíferos (Rao *et al.*, 2001; Torres-Farfán *et al.*, 2003a) aún no se conoce con exactitud la relación funcional entre la hormona y la liberación de cortisol. Los resultados *in vivo* expuestos en esta Memoria (capítulo II) nos permiten proponer una interacción MEL-cortisol en condiciones fisiológicas también en el carpín, si bien tenemos muy presente la compleja regulación del funcionamiento del tejido interrenal y de la producción de cortisol *in vivo*, en la que intervienen, además de la ACTH, la innervación simpática y varios factores locales producidos por el propio tejido interrenal (Gfell *et al.*, 1997; Flik *et al.*, 2006). Por tanto, a fin de reducir la complejidad inherente a los sistemas *in vivo* abordamos la investigación de los posibles efectos de la MEL en la producción de cortisol en un modelo *in vitro* de cultivo de tejido interrenal, cuyos resultados se discuten a continuación.

El cultivo organotípico permite estudiar la respuesta del órgano completo a un determinado tratamiento sin interacción con otros órganos. En el cultivo de tejido interrenal, al ser una estructura formada por diferentes poblaciones celulares (células esteroideogénicas, cromafines, linfoides, etc; Wendelaar Bonga, 1997), y estar rodeado de tejido renal, la respuesta observada será el resultado del efecto del tratamiento sobre todos estos tipos celulares y las interacciones entre ellos (Gfell *et al.*, 1997; Flik *et al.*, 2006). Una purificación previa de las células esteroideogénicas y su posterior cultivo asegura que el tratamiento únicamente afecte a dicha población celular (Hontela *et al.*, 2008). Además, la disgregación celular facilita el acceso directo del

medio de cultivo a todas las células, lo que no es evidente en un cultivo organotípico, en el que el tejido es seccionado en pequeños fragmentos. A pesar de estas limitaciones metodológicas inherentes al sistema de cultivo organotípico empleado en el presente trabajo, esta técnica presenta ciertas ventajas respecto al cultivo celular, principalmente derivadas de la simplicidad y rapidez en el procesado previo al inicio del cultivo y de la conservación del material biológico.

En el presente capítulo hemos realizado dos técnicas de cultivo organotípico diferentes: superfusión y estático. El cultivo en superfusión permite un seguimiento temporal preciso de la respuesta del tejido a un tratamiento, mediante la recogida de fracciones de eluido en periodos de tiempo muy cortos, sin manipulación del tejido. El cultivo estático resulta adecuado cuando no es necesario conocer la evolución temporal de un proceso, sino el efecto neto que un tratamiento produce sobre el tejido, cuando se desea concentrar la cantidad de producto liberado, o conocer el efecto de retroalimentación de dicho producto sobre su propia síntesis y/o liberación.

Nuestros resultados ponen de manifiesto que la MEL regula de forma directa la producción de cortisol por el tejido interrenal en las dos especies de teleósteos estudiadas, el carpín y la trucha arco iris, disminuyendo la liberación total de cortisol, e induciendo una recuperación más rápida de los niveles basales tras la estimulación producida por la ACTH. La liberación basal de cortisol por el tejido interrenal *in vitro*, en ausencia de secretagogos, muestra una gran variabilidad entre especies. Así, la liberación en el carpín (resultados presentes) es muy inferior a la descrita en la lubina (Rotllant *et al.*, 2003), que a su vez es superior a la de dorada (40 veces mayor; Rotllant *et al.*, 2000a, 2000b) o trucha arco iris (30 veces; Balm y Pottinger, 1995). De la comparación de estos datos se confirma un grado distinto de actividad esteroidogénica intrínseca del tejido interrenal dependiendo de la especie, lo que corrobora las diferencias encontradas *in vivo* en los niveles de cortisol circulante que son, en general, superiores en perciformes frente a salmónidos o ciprínidos.

La técnica de cultivo en superfusión de tejido interrenal en presencia de ACTH se ha realizado previamente en numerosas especies de peces, como el salmón plateado (*Oncorhynchus kisutch*, Bradford *et al.*, 1992), la tilapia (Quabius *et al.*, 1997), la dorada (Rotllant *et al.*, 2000a, 2000b, 2006; Ganga *et al.*, 2006), la lubina (Rotllant *et al.*, 2003), la trucha arco iris (Conde-Sieira *et al.*, 2013), la platija (*Platichthys flesus*, Kelsall y Balment, 1998) y la carpa (Ruane *et al.*, 2005; Metz *et al.*, 2005) e incluso en elasmobranquios (Nunez y Trant, 1999). En estos estudios se han utilizado distintos protocolos de estimulación con ACTH: en ocasiones se mantiene la presencia de la hormona en el medio durante todo el tiempo de cultivo (Bradford *et al.*, 1992) frente a diseños en los que la ACTH se añade durante un tiempo muy limitado de 15 min (en la

platija: Kelsall y Balment, 1998; en la carpa: Ruane *et al.*, 2005; en la tilapia: Quabius *et al.*, 1997; presentes resultados en el carpín), 20 min (en la lubina: Rotllant *et al.*, 2003; en la dorada: Rotllant, 2000a, 2000b; Ganga *et al.*, 2006; en la carpa: Metz *et al.*, 2005; en la trucha arco iris: Conde-Sieira *et al.*, 2013), 30 min (en la carpa: Metz *et al.*, 2005) e incluso al finalizar el experimento, para determinar la viabilidad del tejido interrenal (en la lubina: Rotllant *et al.*, 2006). Cada una de estas estrategias experimentales conlleva unas ventajas y unas limitaciones. En el presente estudio, a fin de caracterizar posibles efectos directos de la MEL, se optó por una estimulación de corta duración (15 min), suficiente para incrementar la liberación de cortisol sin que se llegue a activar una retroalimentación negativa ultracorta (como la propuesta en el salmón plateado, Bradford *et al.*, 1992), que pudiese llegar a enmascarar posibles efectos inhibitorios de la MEL.

Al igual que ocurre con los niveles basales de cortisol, en la bibliografía se encuentra una alta variabilidad en la respuesta esteroideogénica interrenal a la estimulación con ACTH, confirmando la diversidad de sensibilidades de los peces en las respuestas *in vivo* ante la exposición a situaciones de estrés (Pottinger, 2010; Cook *et al.*, 2012; Ellis *et al.*, 2012). En nuestro estudio, la estimulación de la liberación de cortisol con ACTH (50 nM) se produce de forma inmediata, con incrementos a los 15 min, máximos de liberación (350%) a los 45 min y recuperación progresiva hasta alcanzar de nuevo la liberación basal a las 4-5 h. Este perfil en el carpín es similar al descrito en la dorada (Rotllant *et al.*, 2000a). Comparando los resultados obtenidos en el sistema de cultivo estático en las dos especies estudiadas, el carpín (ciprínido) y la trucha (salmónido), podemos afirmar que tanto la liberación basal tras el periodo de estabilización, como tras la estimulación con ACTH, son similares en ambas especies, a pesar de ser peces que pueden ser considerados como de respuesta baja y alta, respectivamente, según sus estrategias comportamentales y fisiológicas para combatir el estrés (Pottinger, 2008). Además, tampoco encontramos diferencias en la producción de cortisol a pesar de haber utilizado ejemplares de tamaño corporal muy diferente, discrepando con resultados previos en el salmón plateado que ponen de manifiesto la importancia del tamaño corporal y el estado del desarrollo en la producción de cortisol (Bradford *et al.*, 1992). De hecho, al haber cultivado fragmentos de tejido de tamaño parecido, podemos sugerir que la sensibilidad interrenal a la ACTH es similar en ambas especies.

En teleósteos existen escasos estudios que analicen los mecanismos implicados en la esteroideogénesis. En la trucha arco iris se ha sugerido la intervención de mecanismos de fosforilación de proteínas StAR inactivas que activarían de forma rápida la síntesis de cortisol (Hagen *et al.*, 2006), mientras que en la dorada parece

estar implicado un incremento de la expresión génica de *star* (Castillo *et al.*, 2008). A pesar de que en nuestro estudio no hemos investigado esta cuestión, la rápida respuesta observada *in vitro* apoyaría también para el carpín un tipo de mecanismo similar al propuesto para la trucha arco iris, mientras que a tiempos más largos predominaría una situación similar a la descrita en la dorada, tal y como se observa en los resultados del capítulo II de esta Tesis Doctoral.

Nuestros resultados ponen de manifiesto un papel inhibitorio de la MEL en la liberación de cortisol por el tejido interrenal estimulado con ACTH en las dos especies de teleósteos estudiadas. Como ya se ha comentado, existen evidencias anteriores de acciones directas de la MEL sobre la producción de glucocorticoides en algunos mamíferos. Los primeros estudios *in vitro* publicados mostraban resultados contradictorios: mientras que los extractos pineales de rata y de bóvidos inhiben la síntesis de corticosterona y/o cortisol en preparaciones de corteza adrenal de rata (Mehdi y Sandor, 1977; Ogle y Kitay, 1976; Heiman y Porter, 1980), la MEL en superfusión no modifica la secreción del esteroide en adrenales de la misma especie (Persengiev *et al.*, 1989), aunque en un sistema de cultivo estático la estimula en las ratas macho y la inhibe en las hembras (Lesniewska *et al.*, 1990). Estos resultados no se confirmaron en otro roedor nocturno, el hámster (Lesniewska *et al.*, 1990). Estudios posteriores *in vitro* han coincidido en proponer acciones inhibitorias de la MEL sobre el eje adrenal, y de forma particular sobre los corticosteroides, en varias especies de mamíferos (Torres-Farfán *et al.*, 2003a, 2003b, 2008) incluidos humanos (Slominski *et al.*, 2012; Campino *et al.*, 2011). El presente estudio es el primero en analizar la existencia de una acción directa de la MEL sobre el tejido interrenal de los peces, y los resultados obtenidos confirmarían que la acción inhibitoria de la hormona sobre la liberación de cortisol *in vitro* también ocurre en este grupo de vertebrados.

Los perfiles desfasados de los patrones rítmicos diarios de cortisol (Haus, 2007) y de MEL (Reiter *et al.*, 2010) descritos en numerosas especies de mamíferos apoyarían, de forma general, una inhibición fisiológica MEL/cortisol en estos vertebrados. Sin embargo, en los peces, a pesar de los numerosos estudios realizados en relación con la posible ritmicidad diaria en la producción de cortisol, no existen datos sólidos acerca de su perfil diario, en parte debido a la elevada variabilidad interindividual que puede llegar a ocultar dicha ritmicidad (Boujard y Leatherland, 1992; Cerdá-Reverter *et al.*, 1998; Pavlidis *et al.*, 1999), y que ya ha sido discutida con anterioridad en esta Memoria. Esta conexión funcional entre la MEL y el eje adrenal también se ha puesto de manifiesto en otros resultados de la presente Tesis Doctoral, enfatizando la importancia del tejido interrenal en la organización circadiana de los peces, no sólo mediante la producción rítmica de cortisol sino también por su

relevancia como candidato a albergar un oscilador periférico, pudiendo potencialmente ser una diana de la MEL en su función como agente sincronizador.

Por otro lado, la MEL en el carpín no altera la liberación basal de cortisol por el tejido interrenal no estimulado, coincidiendo con los resultados encontrados en la adrenal de mamíferos *in vitro* (Torres-Farfán *et al.*, 2003a, 2003b; Campino *et al.*, 2008; Richter *et al.*, 2008). La conservación del efecto melatoninérgico únicamente en el tejido estimulado puede estar sugiriendo que la neurohormona, más que ejercer de forma basal acciones a nivel adrenal, podría estar modulando la activación de la glándula ante la exposición a situaciones de estrés. En este sentido, la anticipación observada en la restauración de los niveles basales de cortisol en el tejido cultivado con MEL en comparación con el tejido control (240 frente a 300 min) reforzaría esta hipotética acción anti-estrés propuesta para la hormona y discutida previamente en el capítulo II de la presente Memoria.

La acción inhibitoria de la MEL en el eje adrenal del carpín parece ejercerse de forma directa sobre el propio tejido interrenal, según los presentes resultados *in vitro*, pero desconocemos el/los mecanismo/s subyacente/s que puedan estar implicados. Cabe hipotetizar distintas posibles acciones de la MEL, bien actuando directamente en la liberación de cortisol o bien afectando a enzimas implicadas en la propia esteroidogénesis, como se ha propuesto en la adrenal de mamíferos (Touitou *et al.*, 1989; Torres-Farfán *et al.*, 2003b; Campino *et al.*, 2011), donde la MEL, además de actuar como inhibidor no competitivo de las 17- y 21-hidroxilasas adrenales (Mehdi y Sandor, 1977), inhibe también la expresión y los niveles proteicos de StAR y 3 β HSD (Torres-Farfán *et al.*, 2003b; Campino *et al.*, 2011). El lapso de tiempo necesario en nuestro estudio para observar el efecto inhibidor de la MEL tras la estimulación con ACTH (30 min) apoyaría más un mecanismo de tipo transcripcional sobre enzimas esteroidogénicas que efectos directos en la liberación de cortisol, como sugieren también los resultados del capítulo II de esta Memoria. Además, la MEL también puede reducir la síntesis de cortisol a través de un efecto inhibidor directo en la expresión de genes reloj, como *bmal1* (Valenzuela *et al.*, 2008) que, a su vez, dirige la expresión de genes que contienen elementos *E-box* en su promotor, entre los que se encuentran algunos implicados en la síntesis de cortisol. En este sentido se han publicado algunos resultados en la adrenal de humanos, donde la ACTH incrementa los niveles de BMAL1 y de la proteína StAR, siendo esta activación revertida por la MEL (Campino *et al.*, 2011). Esta propuesta apunta también en la dirección planteada en el capítulo I de esta Memoria en relación con la posible funcionalidad de la MEL como vía de comunicación entre el mecanismo rítmico diario de los genes reloj y el eje ACTH-esteroidogénesis adrenal.

El efecto de la MEL en la glándula interrenal del carpín *in vitro* no es dosis-dependiente, de forma similar a la observada en un primate diurno, el macaco (Torres-Farfán *et al.*, 2003a), pudiendo cuestionar su relevancia fisiológica. Sin embargo, algunos resultados apoyarían la hipótesis de que estamos ante acciones fisiológicas de la MEL que pueden producirse *in vivo*. Por un lado, la reducción de la liberación de cortisol encontrada en nuestro estudio se alcanza con concentraciones de MEL en el medio de un orden de magnitud similar a los niveles circulantes en esta especie (Iigo *et al.*, 1994). Por otro, el efecto inhibitor de la liberación de cortisol se observa a concentraciones de MEL que están en el intervalo de la K_d para los sitios de unión a 2-[¹²⁵I]iodomelatonina en tejidos periféricos en peces (López-Patiño *et al.*, 2012). Además, la acción de la hormona se revierte en presencia de luzindol (antagonista general de los receptores melatoninérgicos), indicando que se trata de un efecto específico, mediado por receptores de membrana. Varios estudios han demostrado la existencia de receptores MT1 en la glándula adrenal de algunos mamíferos (Poirel *et al.*, 2003; Torres-Farfán *et al.*, 2003a, 2003b; Campino *et al.*, 2008; Richter *et al.*, 2008). En la tenca (*Tinca tinca*) se ha descrito una alta densidad de sitios de unión para MEL en el riñón completo, conteniendo el tejido interrenal (López-Patiño *et al.*, 2012), lo que apoyaría la especificidad en las acciones de la MEL descritas en el presente estudio.

Por tanto, nuestros resultados sugieren que el efecto reductor de los niveles circulantes de cortisol ejercido por la MEL *in vivo* podría estar mediado por una acción directa de la hormona sobre la glándula interrenal de los teleósteos, aunque el mecanismo exacto de actuación aun debe ser determinado.

CAPÍTULO IV

**LA MELATONINA COMO AGENTE SINCRONIZADOR DE LA
ACTIVIDAD LOCOMOTORA. EFECTO SOBRE LA EXPRESIÓN
DE GENES RELOJ Y EL CONTENIDO DE MONOAMINAS EN
TEJIDOS CENTRALES DEL CARPÍN**

RESUMEN IV

Múltiples estudios en homeotermos demuestran que la melatonina es una señal circadiana que sincroniza varias funciones fisiológicas y comportamentales, como los ritmos de actividad locomotora. Sin embargo, apenas existe información sobre este aspecto en peces. El objetivo del presente estudio es investigar el posible efecto de un tratamiento crónico con melatonina en la sincronización de los ritmos de actividad locomotora diaria en el carpín en ausencia de los *zeitgebers* ciclo luz/oscuridad y horario de alimentación. Además, nos aproximamos a los mecanismos subyacentes a este efecto estudiando los posibles cambios en los ritmos diarios de expresión de genes reloj y del contenido de monoaminas en dos localizaciones encefálicas: el telencéfalo y el techo óptico.

Para ello, se realizan dos diseños experimentales. En el primero, los carpines se aclimatan a un fotoperiodo 12L:12D (encendido de las luces a las 7:00 h) y se alimentan diariamente a las 10:00 h durante 14 días (fase A). Posteriormente, las condiciones cambian a luz constante y horario de alimentación aleatoria (ausencia de *zeitgebers*, fase B), y 8 días después los peces se inyectan intraperitonealmente con salino (10 µl/g) o melatonina (1 µg/g) a las 9:00 h (CT2) o 21:00 h (CT14) durante 8 días (fase C). Se consideran 4 grupos experimentales: salino a las 9:00 h, melatonina a las 9:00 h, salino a las 21:00 h, melatonina a las 21:00 h. Durante los 7 días siguientes (fase D) la dosis de melatonina se incrementa a 5 µg/g. Posteriormente, el protocolo de inyecciones se revierte, de forma que los peces tratados con salino se inyectan con melatonina y viceversa (fase E). Tras 11 días, se suspenden las inyecciones, manteniendo las condiciones de luz constante y alimentación aleatoria (fase F, 14 días). Finalmente, las condiciones retornan a un fotoperiodo de 12L:12D y alimentación diaria a las 10:00 h durante 7 días (fase G). La actividad locomotora se registra a lo largo de todo el experimento.

Los carpines mantenidos en condiciones 12L:12D y alimentación con horario fijo (fases A y G) muestran un patrón diurno de actividad locomotora con una periodicidad circadiana ($\tau = 24,0$ h), que se pierde en ausencia de ambos *zeitgebers* (fases B y F). El tratamiento con melatonina sincroniza la actividad locomotora, restaurando un ritmo similar al observado en las fases A y G, únicamente cuando se inyecta a las 21:00 h (y no a las 9:00 h). El efecto sincronizador de la hormona es dosis-dependiente, se mantiene durante 7 días tras la retirada de la hormona, y desaparece después de forma progresiva, lo que no apoya un hipotético efecto de enmascaramiento de las inyecciones.

El segundo experimento consta de 3 fases idénticas a las fases A, B y D del primer experimento (durante 30, 16 y 16 días, respectivamente), aunque solo se consideran 2 grupos experimentales: carpines inyectados intraperitonealmente con salino (10 µl/g) o melatonina (5 µg/g) a las 21:00 h. Al final de la fase D, se muestrean el telencéfalo y el techo óptico en intervalos de 6 h durante un ciclo completo de 24 h para analizar la expresión de genes reloj (*per1*, *per2*, *per3* y *cry3*) y cuantificar el contenido de monoaminas (adrenalina, noradrenalina, dopamina, L-DOPA, DOPAC, serotonina y 5-HIAA).

Los resultados en relación con la actividad motora coinciden con el primer experimento, mostrando arritmicidad en ausencia de los *zeitgebers* y restaurando el ritmo con las inyecciones de melatonina a las 21:00 h. No se encuentran ritmos significativos de expresión de los genes reloj en los peces inyectados con salino en condiciones de luz constante y alimentación aleatoria, mientras que los carpines tratados con melatonina muestran ritmos diarios significativos de expresión de *per1a* y *per3* en el telencéfalo y techo óptico, y de *cry3* en el telencéfalo. Esta sincronización de la expresión de genes reloj inducida por melatonina coincide con los resultados publicados en mamíferos, y sugiere que la hormona podría estar actuando en la maquinaria molecular de los osciladores para generar ritmos de genes reloj que finalmente dirigirían la sincronización de la actividad locomotora. Respecto a las monoaminas, los carpines tratados con melatonina muestran un ritmo en la tasa de recambio de dopamina en el telencéfalo y en el contenido de dopamina y serotonina en el techo óptico. Sin embargo, nuestros resultados, en coincidencia con datos previos en homeotermos, no permiten concluir que la sincronización de la actividad locomotora por melatonina esté mediada por una modulación del contenido de monoaminas encefálicas.

En conclusión, los presentes resultados muestran por primera vez en peces que la melatonina exógena puede actuar como un sincronizador de los ritmos diarios de actividad locomotora en ausencia de los *zeitgebers* ciclo luz/oscuridad y horario de alimentación, y sugieren la existencia de una sensibilidad diaria a la acción de la hormona. Este efecto de la melatonina podría estar mediado por la sincronización de la expresión de genes reloj en osciladores telencefálicos y del techo óptico.

SUMMARY IV

Several studies in homeotherms show that melatonin is a circadian signal that synchronizes various behavioural and physiological functions, such as locomotor activity rhythms. However, scarce information on this issue is available in fish. The objective of the present study is to investigate the possible effect of a chronic treatment with melatonin on the synchronization of daily locomotor activity rhythms in goldfish in the absence of light/dark cycle and feeding time *zeitgebers*. Moreover, we approach to the mechanisms underlying this effect by studying possible changes in daily rhythms of clock genes expression and monoamines content in two brain locations: the telencephalon and the optic tectum.

We carry out two experimental designs. First, goldfish are acclimated to a 12L:12D photoperiod (lights on at 7:00 h) and scheduled feeding at 10:00 h during 14 days (phase A). Then, environmental conditions change to constant light and random feeding (absence of *zeitgebers*, phase B), and 8 days afterwards fish are intraperitoneally injected with saline (10 µl/g) or melatonin (1 µg/g) at either 9:00 h (CT2) or 21:00 h (CT14) during 8 days (phase C). Fish are divided into 4 experimental groups: saline at 9:00 h, melatonin at 9:00 h, saline at 21:00 h, melatonin at 21:00 h. During the following 7 days (phase D) melatonin dose is increased to 5 µg/g. Then, the protocol of injections is reversed, i.e. saline-treated fish are injected with melatonin and vice versa (phase E). After 11 days, injections are finished, maintaining constant light and random feeding (phase F, 14 days). Finally, conditions return to 12L:12D photoperiod and scheduled feeding at 10:00 h during 7 days (phase G). Locomotor activity is registered throughout the experiment.

Goldfish maintained under 12L:12D and scheduled feeding conditions (phases A and G) show a diurnal pattern of locomotor activity with a circadian periodicity ($\tau = 24.0$ h), that is lost in the absence of both *zeitgebers* (phases B and F). Melatonin treatment synchronizes locomotor activity, restoring a rhythm similar to the one observed in phases A and G, but only when injected at 21:00 h (but not at 9:00 h). The synchronizing effect of the hormone is dose-dependent, remains for 7 days after hormone withdrawal and disappears progressively, which does not support a hypothetical masking effect of the injections.

The second experiment consists on 3 phases identical to phases A, B and D of the first experiment (during 30, 16 and 16 days, respectively), although we only consider two experimental groups: goldfish intraperitoneally injected with saline (10 µl/g) or melatonin (5 µg/g) at 21:00 h. At the end of phase D, telencephalon and optic tectum are sampled at 6 h intervals during a whole 24-h cycle to analyse clock genes

expression (*per1*, *per2*, *per3* and *cry3*) and to quantify monoamines content (epinephrine, norepinephrine, dopamine, L-DOPA, DOPAC, serotonin and 5-HIAA).

Results regarding motor activity are coincident with the first experiment, showing a lack of rhythm in the absence of *zeitgebers* and restoring it by melatonin injections at 21:00 h. No significant rhythms of clock genes expression are found in saline-injected fish under constant light and random feeding conditions, while melatonin-treated goldfish show significant daily rhythms of *per1a* and *per3* expression in telencephalon and optic tectum, and *cry3* in telencephalon. This melatonin-induced synchronization of clock genes expression agrees with results in mammals, and suggests that the hormone could be acting on the molecular machinery of the oscillators to generate clock genes rhythms that finally would drive daily locomotor activity synchronization. Regarding to monoamines, melatonin-treated goldfish show a rhythm in dopamine turnover in telencephalon and dopamine and serotonin in optic tectum. However, our results, as previous data in homeotherms, do not allow concluding that the synchronization of locomotor activity by melatonin is mediated by a modulation in brain monoamines content.

In conclusion, present results show for the first time in fish that exogenous melatonin can act as a synchronizer of daily locomotor activity rhythms in the absence of light/dark cycle and feeding time *zeitgebers*, and suggest the existence of a daily sensitivity to the action of the hormone. This effect of melatonin could be mediated by synchronizing clock genes expression in telencephalic and optic tectum oscillators.

IV.1. OBJETIVO.

En este capítulo se ha estudiado si un tratamiento crónico con MEL puede sincronizar un parámetro comportamental como la actividad locomotora, así como la expresión de genes reloj y el nivel de neurotransmisión monoaminérgica encefálica en el carpín. Para ello, se realizaron los siguientes diseños experimentales.

IV.2. SINCRONIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD LOCOMOTORA POR MELATONINA.

IV.2.1. DISEÑO EXPERIMENTAL.

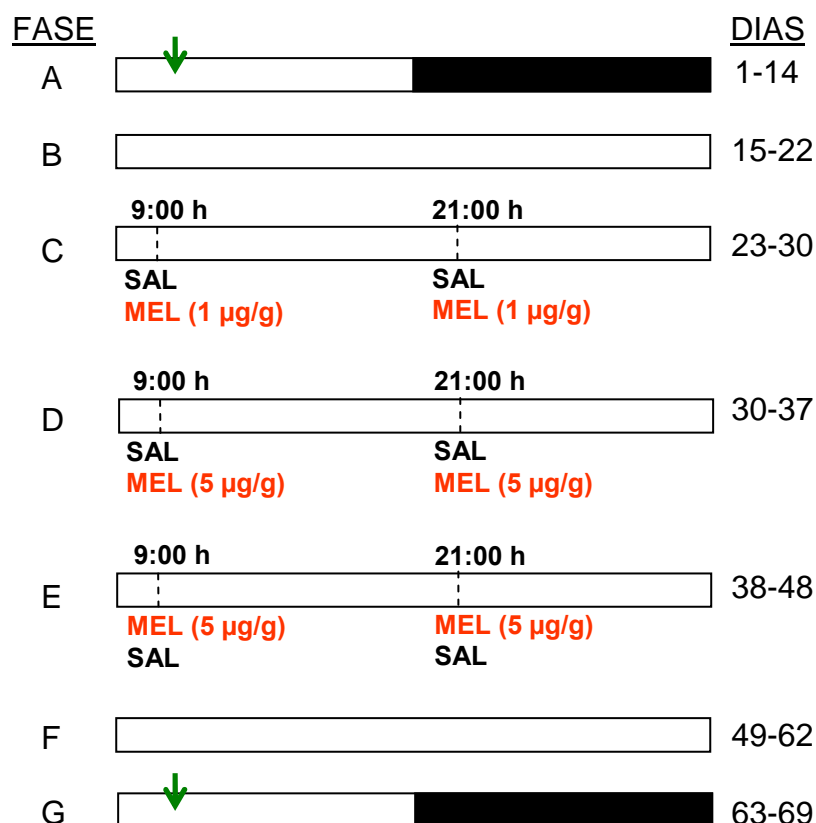
Los carpines ($6,40 \pm 0,15$ g) se mantuvieron en acuarios de 60 l ($n=18/\text{grupo}$, 9 peces/acuario), y fueron aclimatados durante 2 semanas a un fotoperiodo 12L:12D (encendido de las luces a las 7:00 h) y alimentación diaria a las 10:00 h (1% pc). Durante esta fase de aclimatación (Fase A), todos los peces mostraron un patrón de actividad claramente diurno. Transcurridas las 2 semanas de aclimatación, con el fin de eliminar los *zeitgebers* ciclo luz/oscuridad y horario de alimentación, los carpines se mantuvieron en condiciones de luz constante (24L) y alimentación con horario aleatorio durante 8 días (Fase B), hasta observar la pérdida total de ritmicidad de actividad locomotora. A partir de entonces, se inició el tratamiento con MEL (o salino en los grupos control) mediante inyecciones IP diarias durante 8 días (Fase C), manteniendo las mismas condiciones ambientales (24L y alimentación aleatoria) aplicadas en la fase B.

Se realizaron los siguientes 4 grupos experimentales ($n=18/\text{grupo}$):

- Grupo 1: inyectado con solución salina (10 $\mu\text{l/g pc}$) a las 9:00 h (CT2).
- Grupo 2: inyectado con MEL (1 $\mu\text{g/g pc}$) a las 9:00 h (CT2).
- Grupo 3: inyectado con solución salina (10 $\mu\text{l/g pc}$) a las 21:00 h (CT14).
- Grupo 4: inyectado con MEL (1 $\mu\text{g/g pc}$) a las 21:00 h (CT14).

Tras este primer periodo de inyecciones durante 8 días, se aumentó la dosis de MEL a 5 $\mu\text{g/g pc}$ y se continuó inyectando 7 días más, manteniendo los mismos grupos experimentales (Fase D). Finalizados los 15 días de inyecciones, se procedió a invertir los tratamientos (Fase E), de modo que los peces que recibieron inyecciones de salino en las Fases C y D, pasaron a ser inyectados con MEL (5 $\mu\text{g/g pc}$), mientras que los animales inyectados con MEL en las Fases C y D, pasaron a recibir inyecciones de solución salina. Este tercer periodo de inyecciones se prolongó durante 11 días (Fase E). Finalmente, durante 14 días (Fase F) se suspendió el tratamiento, conservando las condiciones de 24L y alimentación aleatoria, seguido de un periodo de 7 días (Fase G) en el que se recuperaron ambos *zeitgebers* (12L:12D, alimentación diaria a las 10:00 h), exponiendo a los peces a las mismas condiciones que en la fase inicial del estudio (Fase A).

En el siguiente esquema se resume el diseño experimental realizado:



Esquema 4.1. Diseño experimental utilizado en el estudio del efecto de la MEL como sincronizador de la actividad locomotora en el carpín. Las barras blancas y negras representan las fases de luz y oscuridad, respectivamente, del fotoperiodo 12L:12D, y las barras blancas completas representan condiciones de luz continua (24L). Las flechas verdes indican la hora de alimentación (10:00 h) en las Fases A y G. En el resto de fases, la alimentación fue aleatoria. La línea discontinua indica el horario de inyección.

Durante todo el experimento se registró la actividad locomotora de forma ininterrumpida mediante 3 fotocélulas adheridas a las paredes de los acuarios (véase el apartado 2.5.2. de la sección de Materiales y métodos). El peso corporal se determinó al inicio de cada fase (A-G), y antes de realizar las inyecciones en las Fases C, D y E. Semanalmente, inmediatamente antes de inyectar, se extrajeron muestras de sangre para cuantificar los niveles plasmáticos de cortisol (apartado 2.5.6.2. de la sección de Materiales y métodos).

IV.2.2. RESULTADOS.

En las Figuras 4.1-4.4 se representan los actogramas (izquierda) y periodogramas (derecha) obtenidos de los registros de actividad locomotora en un

acuario representativo de cada uno de los cuatro grupos de peces a lo largo de las distintas fases experimentales (peces inyectados a las 9:00 h, Figuras 4.1 y 4.2; peces inyectados a las 21:00 h, Figuras 4.3 y 4.4).

Durante la Fase A (fotoperiodo 12L:12D y alimentación diaria a las 10:00 h) los carpines de todos los grupos experimentales muestran un ritmo circadiano de actividad locomotora con un patrón claramente diurno y un periodo de 24 h. Además, se observa una actividad anticipatoria al alimento (FAA), que corrobora la sincronización de los peces al horario de alimentación. La exposición a condiciones de luz constante y alimentación aleatoria (Fase B) produce una pérdida de ritmicidad de la actividad locomotora en todos los grupos experimentales, que pasan a mostrar periodos mayores de 24 h (Figuras 4.1-4.3), o de forma totalmente aleatoria a lo largo de las 24 h (Figura 4.4).

La inyección diaria de MEL a la dosis de 1 µg/g (Fase C) recupera un ritmo diario significativo ($\tau = 24,0$ h) en los carpines inyectados a las 21:00 h (Figura 4.4), pero no en los inyectados a las 9:00 h (Figura 4.2). Al incrementar la dosis de MEL a 5 µg/g (Fase D) se conserva el periodo del ritmo de actividad, aumentando la significación del mismo en los carpines inyectados a las 21:00 h (Figura 4.4), si bien esta dosis superior de MEL sigue sin tener ningún efecto en el ritmo de actividad locomotora cuando se administra a las 9:00 h (Figura 4.2). En estas Fases C y D, los carpines controles inyectados con salino se mueven de forma arrítmica, tanto a las 9:00 h como a las 21:00 h (excepto en la Fase C del grupo inyectado a las 9:00 h).

Al cruzar el protocolo de inyecciones (Fase E), los registros de actividad locomotora en los peces inyectados a las 9:00 h no muestran cambios significativos respecto a la etapa anterior (tanto en los inyectados con salino como en los tratados con MEL), y continúan moviéndose de forma arrítmica, independientemente del tratamiento recibido (Figuras 4.1 y 4.2). Sin embargo, los carpines inyectados con MEL a las 21:00 h en las Fases C y D pierden la sincronización de su actividad inducida por MEL al pasar a recibir inyecciones con salino en la Fase E. No obstante, el momento del máximo de actividad registrado durante la fase de inyecciones con MEL se mantiene hasta 7 días después de la retirada de la indolamina (Figura 4.4, recuadro amarillo). Los peces controles inyectados a las 21:00 h con salino, arrítmicos en las Fases C y D (Figura 4.3), muestran en su periodograma un ritmo significativo de actividad locomotora ($\tau = 24,0$ h) tras recibir inyecciones diarias de MEL a la dosis de 5 µg/g durante 11 días (Fase E, Figura 4.3).

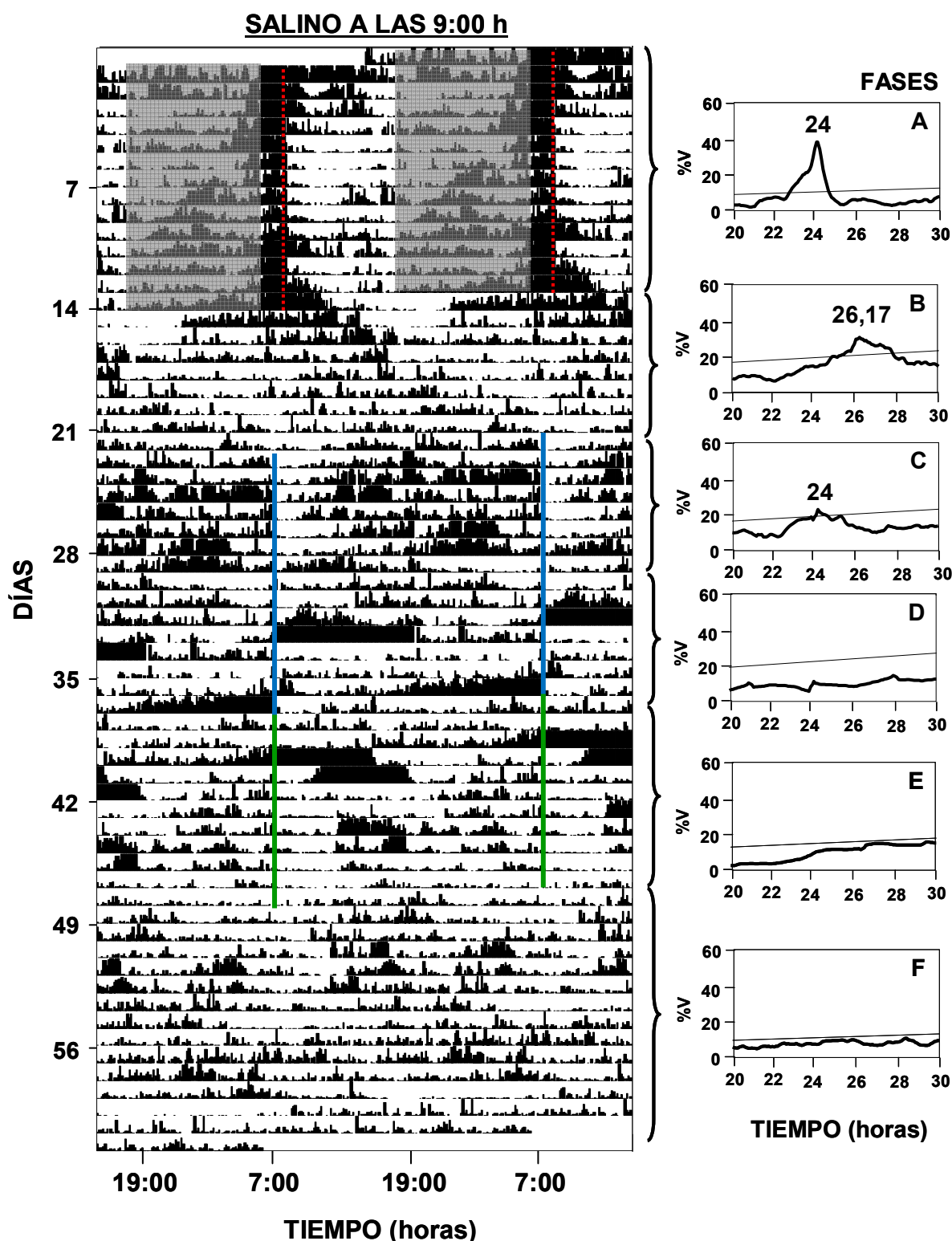


Figura 4.1. Actograma (izquierda) y periodogramas (derecha) de los carpines inyectados con salino (10 μ l/g) a las 9:00 h ($n=9$ /grupo). Las fases experimentales (A-F) se describen detalladamente en el diseño experimental. La zona sombreada representa el periodo de oscuridad. La línea roja punteada indica la hora de alimentación en la fase A (10:00 h). Las líneas azul y verde señalan la hora de las inyecciones de salino y melatonina (5 μ g/g), respectivamente. El número sobre los picos del periodograma indica el valor del periodo.

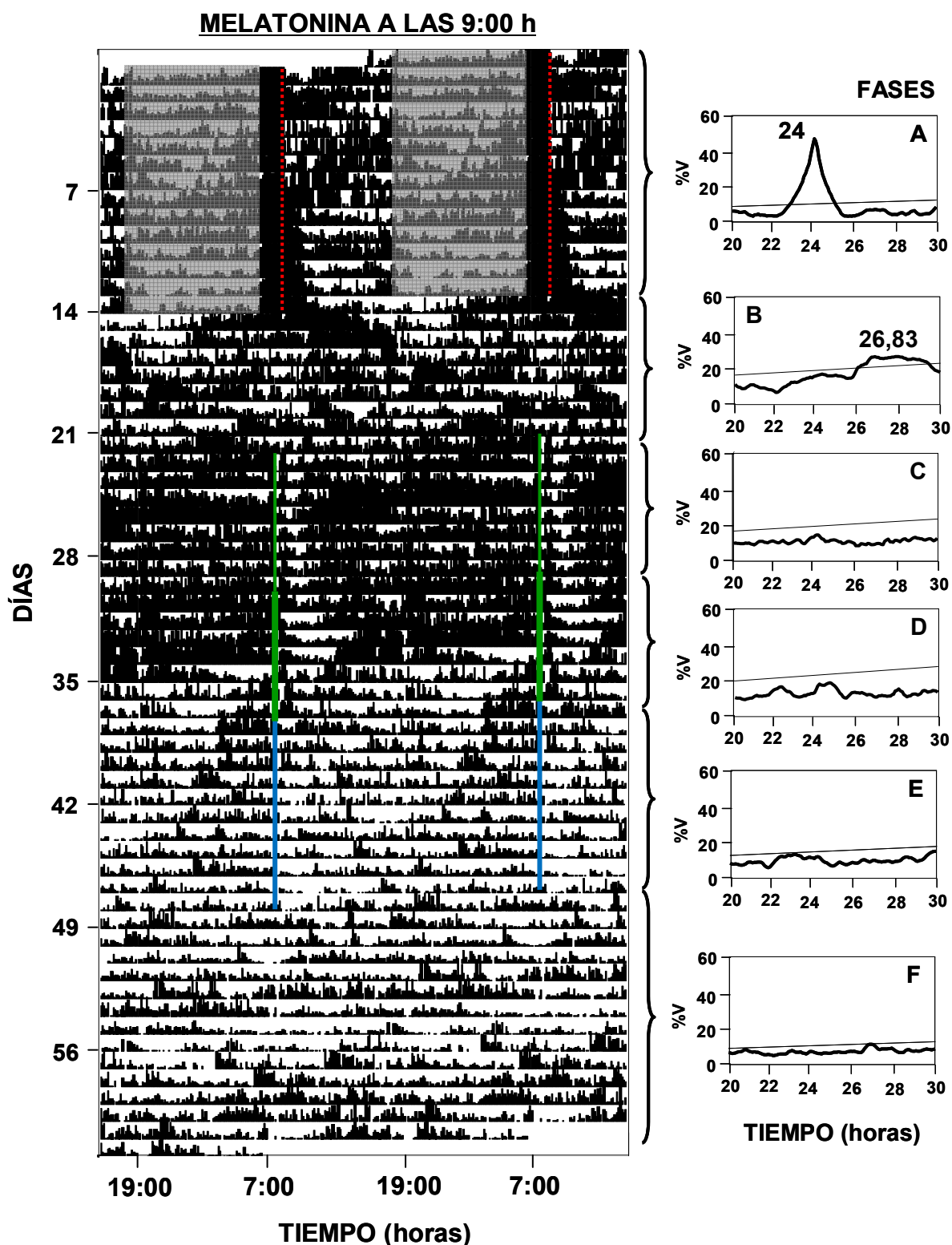


Figura 4.2. Actograma (izquierda) y periodogramas (derecha) de los carpines inyectados con melatonina a las 9:00 h ($n=9$ /grupo). Las fases experimentales (A-F) se describen detalladamente en el diseño experimental. La zona sombreada representa el periodo de oscuridad. La línea roja punteada indica la hora de alimentación en la fase A (10:00 h). Las líneas verdes delgada y gruesa indican las inyecciones de melatonina (1 y 5 µg/g, respectivamente). La línea azul indica la hora de la inyección de salino (10 µl/g). El número sobre los picos del periodograma indica el valor del periodo.

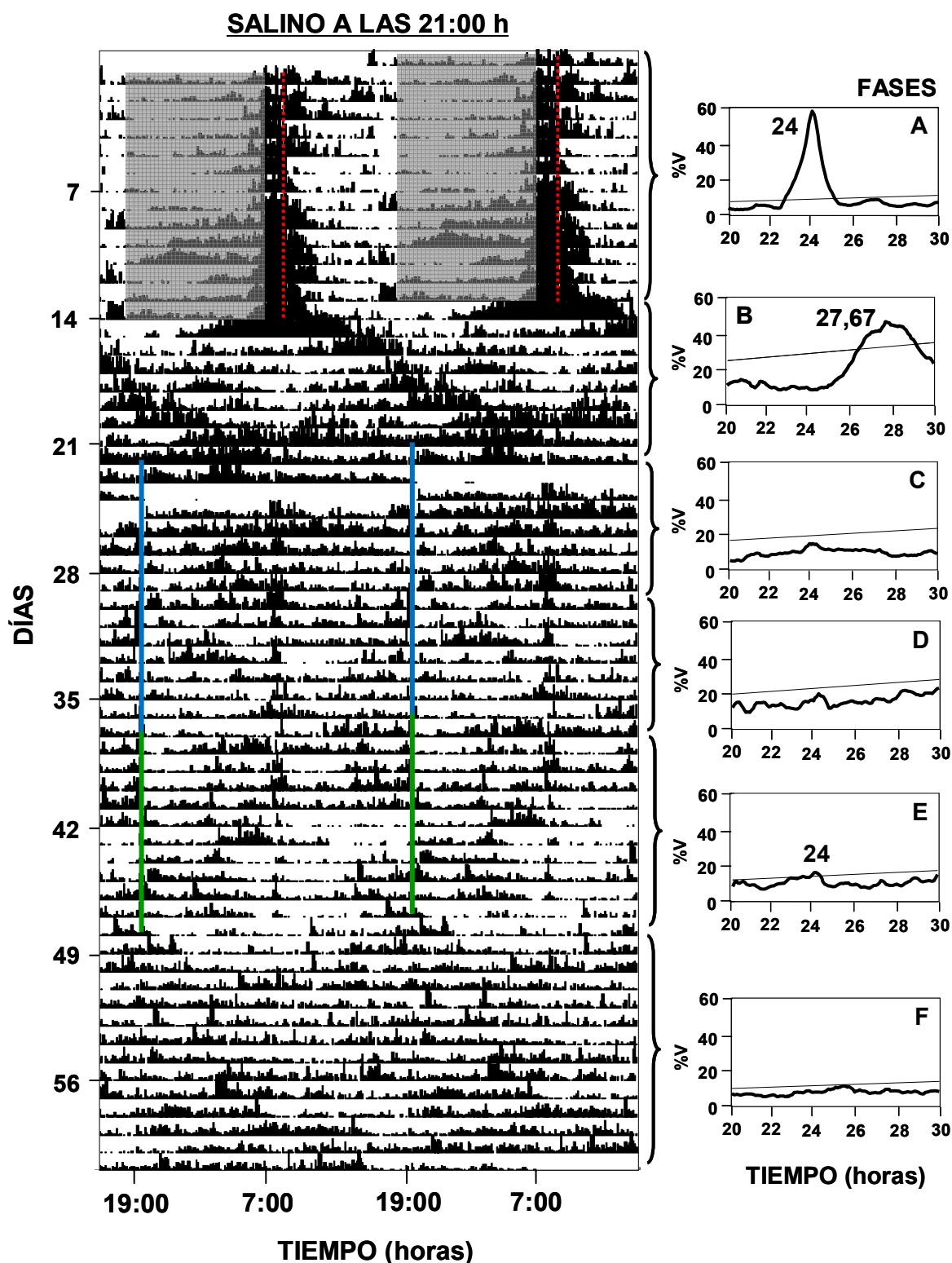


Figura 4.3. Actograma (izquierda) y periodogramas (derecha) de los carpines inyectados con salino (10 μ l/g) a las 21:00 h ($n=9$ /grupo). Las fases experimentales (A-F) se describen detalladamente en el diseño experimental. La zona sombreada representa el periodo de oscuridad. La línea roja punteada indica la hora de alimentación en la fase A (10:00 h). Las líneas azul y verde señalan la hora de las inyecciones de salino y melatonina (5 μ g/g), respectivamente. El número sobre los picos del periodograma indica el valor del periodo.

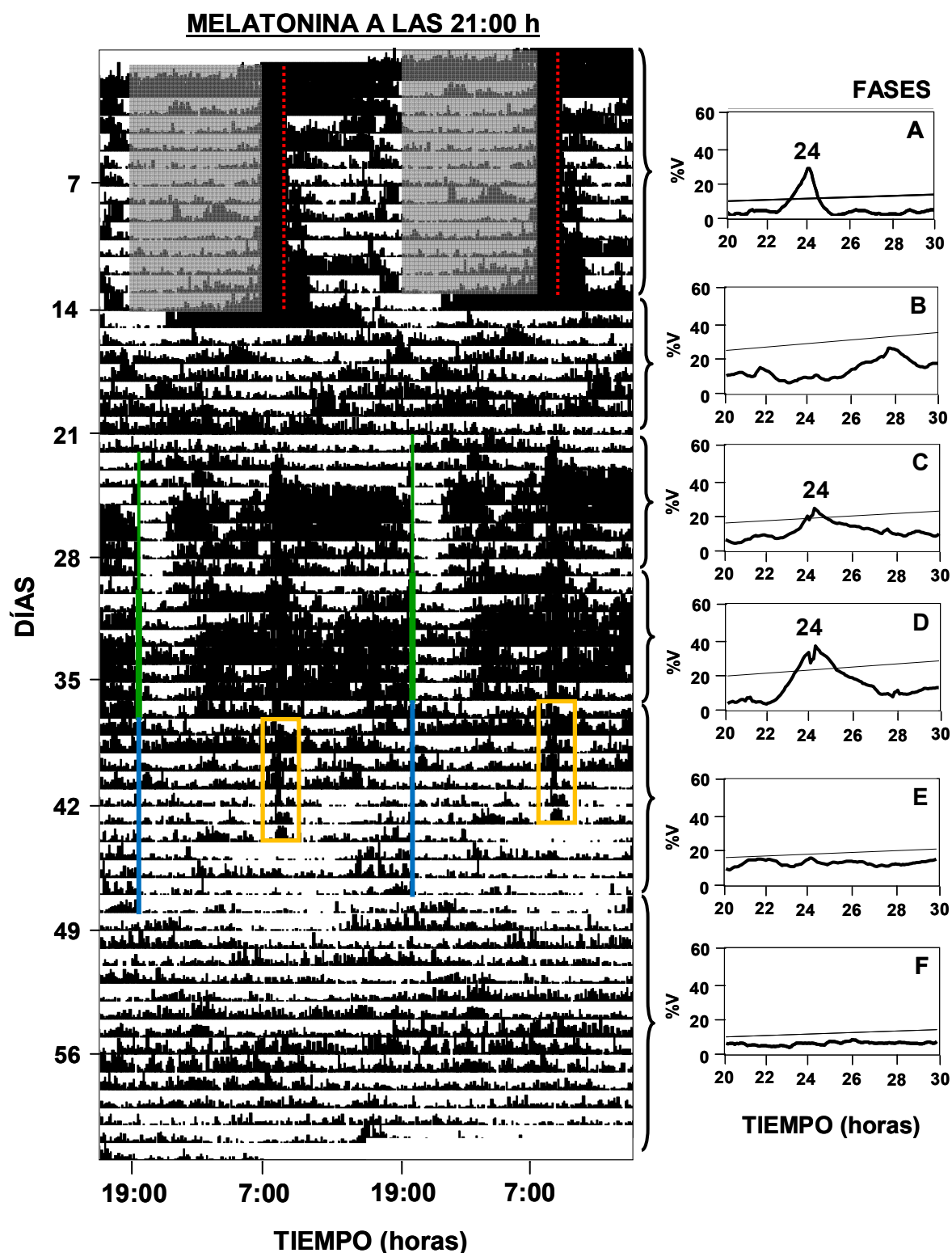


Figura 4.4. Actograma (izquierda) y periodogramas (derecha) de los carpines inyectados con melatonina a las 21:00 h ($n=9$ /grupo). Las fases experimentales (A-F) se describen detalladamente en el diseño experimental. La zona sombreada representa el periodo de oscuridad. La línea roja punteada indica la hora de alimentación en la fase A (10:00 h). Las líneas verdes delgada y gruesa indican las inyecciones de melatonina (1 y 5 µg/g, respectivamente). La línea azul indica la hora de inyección de salino (10 µl/g). El rectángulo amarillo resalta el tiempo de máxima actividad que se mantiene durante 7 días inyectando salino, tras suprimir la administración de melatonina. El número sobre los picos del periodograma indica el valor del periodo.

Finalizado el periodo de inyecciones, los cuatro grupos de peces en condiciones de luz continua y alimentación aleatoria (Fase F) muestran una actividad locomotora arrítmica. La recuperación de condiciones fotoperiódicas de 12L:12D y alimentación diaria con horario fijo a las 10:00 h (Fase G) restauró en todos los grupos experimentales un ritmo robusto de actividad locomotora (resultados mostrados en la Fase A de la Figura 4.8 de este capítulo) similar al mostrado en la Fase A, con un periodo de 24 h.

El promedio de actividad locomotora en las diferentes fases del estudio se muestra en las Figuras 4.5 y 4.6 para los peces inyectados a las 9:00 h y las 21:00 h, respectivamente. En todos los casos la administración de MEL reduce de forma aguda la actividad locomotora, efecto que resulta más evidente en los peces inyectados a las 21:00 h. En estos peces se observa, además, una aparente respuesta dosis-dependiente de la MEL, ya que la inyección de 1 µg/g (Fase C) reduce la actividad locomotora durante las 2 h posteriores, mientras que tras la inyección de la dosis de 5 µg/g (Fase D) la reducción de actividad se prolonga durante 4 h aproximadamente.

En la Figura 4.7 se representa la evolución de la actividad locomotora total registrada a lo largo del estudio agrupada en las correspondientes fases diurna o día subjetivo (7:00-19:00 h) y nocturna o noche subjetiva (19:00-7:00 h). En presencia de un fotoperiodo 12L:12D y alimentación a las 10:00 h (Fase A) los carpines de todos los grupos muestran niveles de actividad locomotora significativamente superiores durante la fase diurna respecto a la nocturna. La exposición a 24L y alimentación aleatoria hace desaparecer este patrón de actividad, mostrando valores totales de actividad locomotora similares durante el día y la noche subjetivos (Fase B). La administración de MEL a las 21:00 h, a las 2 dosis ensayadas (Fases C y D), induce la aparición de nuevo de un patrón diurno de actividad, similar al observado en la Fase A, si bien la diferencia de actividad total entre el día y la noche subjetivos es solo significativa con la mayor (5 µg/g) de las dos dosis utilizadas. Este efecto sincronizador de la MEL no se observa cuando la neurohormona se administra a las 9:00 h ni en los peces inyectados con solución salina. La suspensión del tratamiento con MEL produce la desaparición de este patrón diurno de actividad (Fases E y F), que no se recupera hasta que los peces vuelven a estar expuestos a un fotoperiodo 12L:12D y alimentación con horario fijo (Fase G, resultados mostrados en la Fase A de la Figura 4.8).

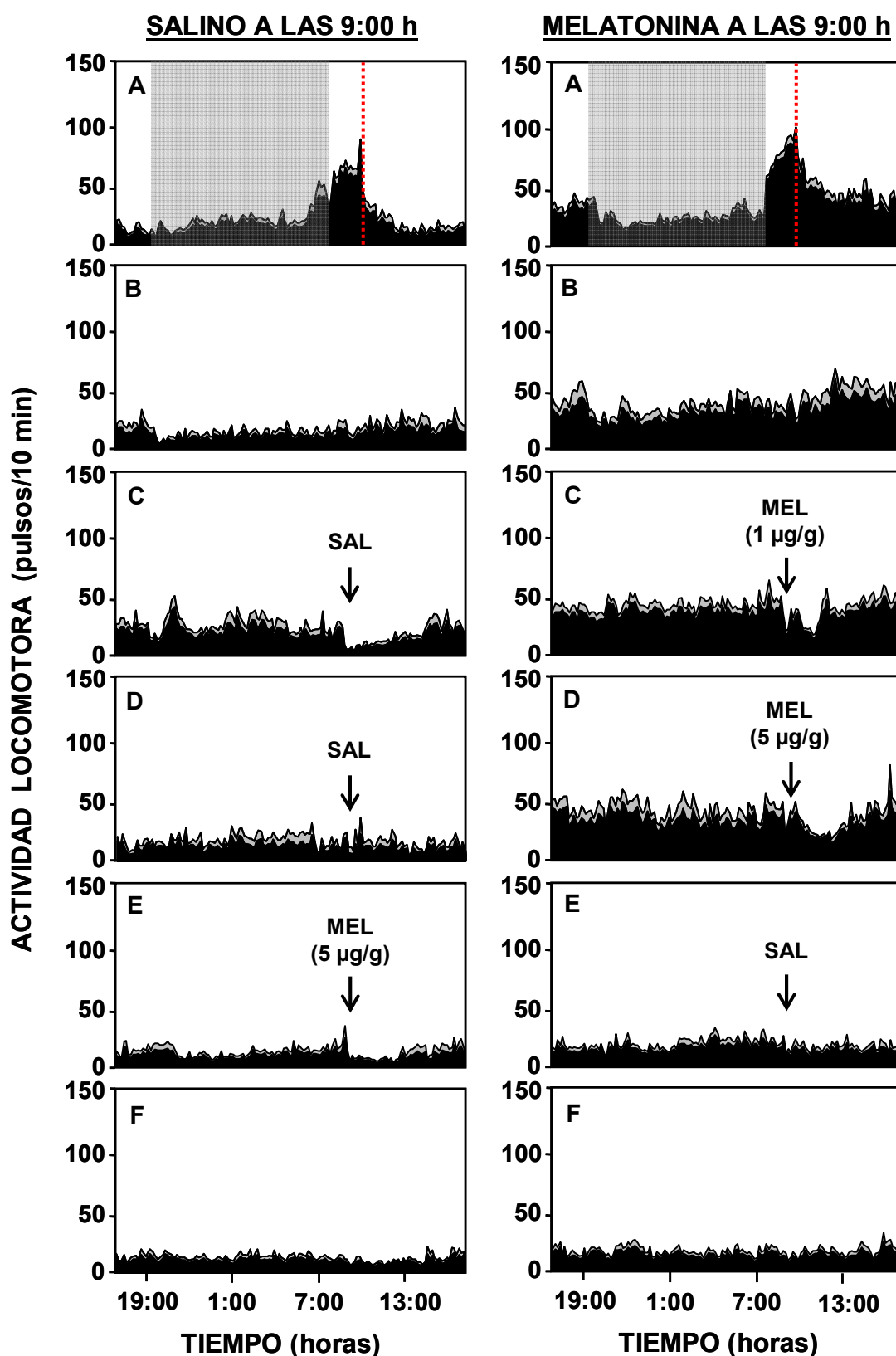


Figura 4.5. Promedio de actividad locomotora en cada fase experimental (A-F) en los carpines inyectados con salino (SAL, 10 μ l/g, izquierda) y melatonina (MEL, 1 y 5 μ g/g, derecha) a las 9:00 h ($n=9$ /grupo). Los datos se expresan como la media (área negra) más el e.e.m. (área gris superpuesta). Las fases experimentales se describen detalladamente en el diseño experimental. La zona sombreada representa el periodo de oscuridad. La línea roja punteada indica la hora de alimentación en la fase A (10:00 h). Las flechas indican la hora de las inyecciones.

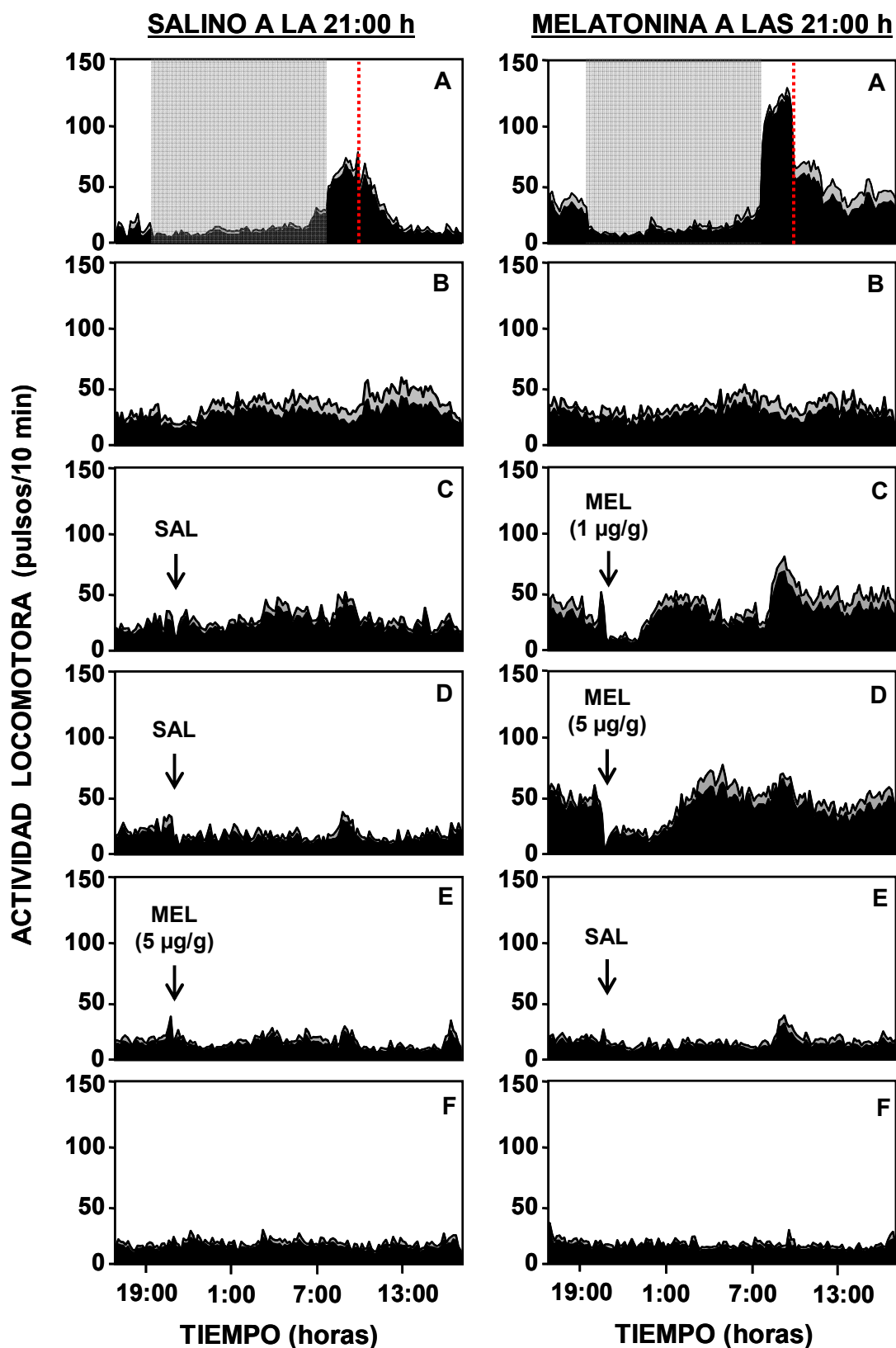


Figura 4.6. Promedio de actividad locomotora en cada fase experimental (A-F) en los carpines inyectados con salino (SAL, 10 µl/g, izquierda) y melatonina (MEL, 1 y 5 µg/g, derecha) a las 21:00 h (n=9/grupo). Los datos se expresan como la media (área negra) más el e.e.m. (área gris superpuesta). Las fases experimentales se describen detalladamente en el diseño experimental. La zona sombreada representa el periodo de oscuridad. La línea roja punteada indica la hora de alimentación en la fase A (10:00 h). Las flechas indican la hora de las inyecciones.

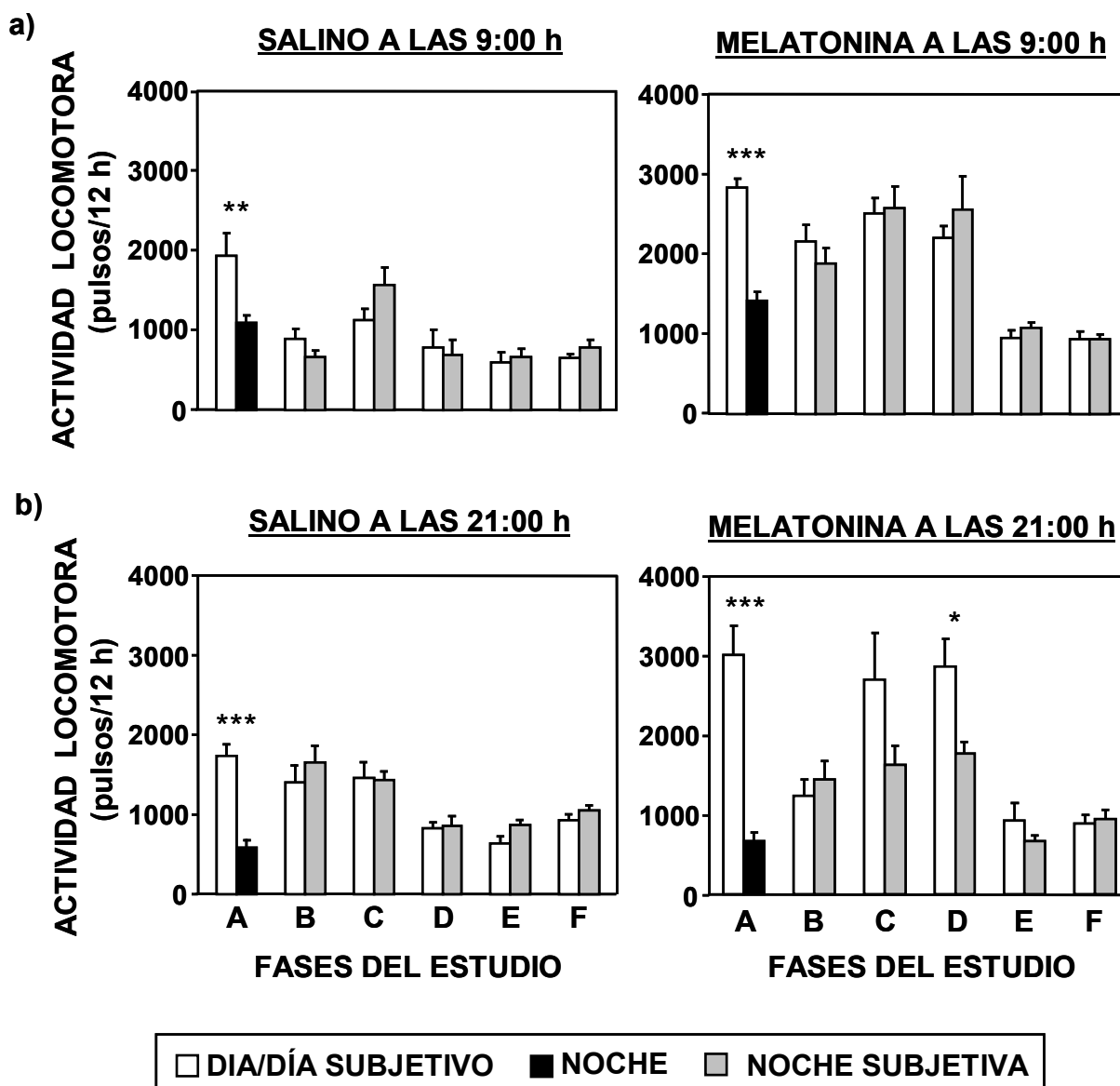


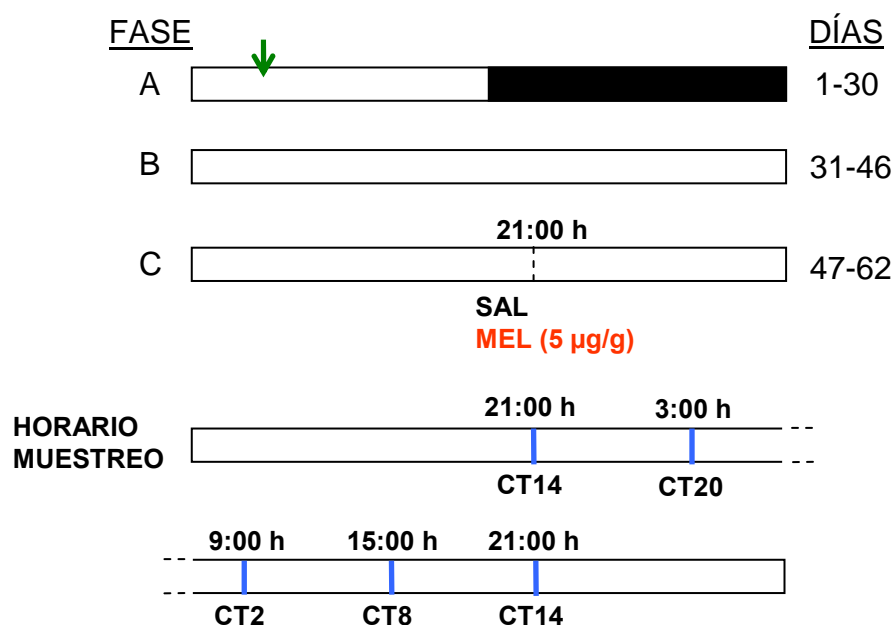
Figura 4.7. Actividad locomotora total registrada en las fases diurna o día subjetivo (7:00-19:00 h) y nocturna o noche subjetiva (19:00-7:00 h) en los carpines inyectados con salino (10 µl/g) o melatonina (1 y 5 µg/g) a las 9:00 h (a) y a las 21:00 h (b). Las fases experimentales (A-F) se describen detalladamente en el diseño experimental. Los datos representan la suma de la actividad diaria registrada en cada uno de los periodos y se expresan como la media ± e.e.m. de todos los días de cada fase (n=7-14 días/fase). * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001, entre periodos dentro de cada fase.

El peso corporal de los peces se mantuvo constante en los 4 grupos experimentales a lo largo de las diferentes fases del estudio (datos no mostrados). Los niveles plasmáticos de cortisol tampoco se modificaron significativamente por los distintos tratamientos, si bien los peces inyectados con MEL a las 21:00 h presentan valores ligeramente inferiores a los de los peces control (control: 160,02 ± 25,19 ng/ml; MEL: 103,13 ± 10,31 ng/ml).

IV.3. EFECTOS DE LA MELATONINA EN LA RITMICIDAD DE LA EXPRESIÓN DE GENES RELOJ Y DEL SISTEMA MONOAMINÉRGICO EN EL CARPÍN.

IV.3.1. DISEÑO EXPERIMENTAL.

En este diseño experimental se utilizaron 60 carpines ($7,40 \pm 0,18$ g) procedentes del estudio anterior que se mantuvieron en acuarios de 60 l ($n=9$ /acuario) durante 30 días, en condiciones de 12L:12D (encendido de las luces a las 7:00 h) y alimentación diaria a las 10:00 h (1% pc) (Fase A). A continuación se utilizó un protocolo experimental idéntico al anterior, correspondiente a las Fases B (durante 16 días) y C (durante 15 días). Al no haber encontrado en el estudio anterior resultados relevantes en los grupos de peces inyectados a las 9:00 h (CT2), en la Fase C se suprimió éste grupo realizando únicamente los tratamientos a las 21:00 h (CT14), con solución salina a los peces control o con MEL (5 μ g/g) a los experimentales (Esquema 4.2). Finalizado el periodo de inyecciones (15 días), los peces se sacrificaron a lo largo de un ciclo completo de 24 horas en intervalos de 6 horas ($n=6$ /hora), empezando en CT14 y habiendo transcurrido 24 h desde la última administración de alimento. Rápidamente se extrajeron el techo óptico y el telencéfalo, que fueron divididos en 2 mitades, una para cuantificar la expresión de genes reloj mediante qRT-PCR, y la otra mitad se destinó al análisis del contenido de monoaminas por HPLC-EC (apartados 2.5.8.9.c y 2.5.7, respectivamente, de la sección de Materiales y métodos).



Esquema 4.2. Diseño experimental utilizado en el estudio del efecto de la MEL en la ritmicidad de la expresión de genes reloj y monoaminas en el carpín. La barra blanca y negra representan las fases de luz y oscuridad, respectivamente, del fotoperiodo 12L:12D, y las barras blancas completas indican condiciones de luz continua (24L). La flecha verde indica la hora de alimentación (10:00 h) en la Fase A. En las fases B y C la alimentación fue aleatoria. La línea discontinua vertical indica el horario de inyección. Las líneas azules indican el horario de muestreo. CT = tiempo circadiano.

La actividad locomotora se registró ininterrumpidamente a lo largo de todo el experimento mediante 3 fotocélulas adheridas a las paredes de los acuarios (apartado 2.5.2. de la sección de Materiales y métodos). Al inicio de cada fase experimental y antes de las inyecciones en la Fase C se realizó un seguimiento del peso corporal.

La Tabla 4.1 muestra los números de acceso de los genes analizados, las secuencias de los cebadores utilizados y el tamaño de los amplicones obtenidos.

Tabla 4.1. Números de acceso, secuencia de cebadores y tamaño de los amplicones de genes reloj y del gen de referencia (β -actina) cuya expresión se analizó mediante qRT-PCR en el telencéfalo y el techo óptico del carpín.

Gen		Secuencia (5'→3')	Tamaño amplicón (pb)	Número acceso (Genbank)
<i>per1a</i>	Forward	5'-AGCGCCACTTCCTCCTCTGA-3'	130	EF690698
	Reverse	5'-CCAACGGACAGCAGGTCTTCA-3'		
<i>per2a</i>	Forward	5'-TTTGTCAATCCCTGGAGCCGC-3'	116	EF690697
	Reverse	5'-CGTGGCTGAGGGCAAATCCTT-3'		
<i>per3</i>	Forward	5'-GGCTATGGCAGTCTGGCTAGTAA-3'	130	EF690699
	Reverse	5'-AAGGCAACCCGATCTGTGTGC-3'		
<i>cry3</i>	Forward	5'-GGTGAGACAGAAGCCCTGGAA-3'	102	EF690702
	Reverse	5'-CGCTCAATCACTGTTCGCAAGC-3'		
β -actina	Forward	5'-GGCCTCCCTGTCTATCTTCC-3'	156	AB039726
	Reverse	5'-TTGAGAGGTTTGGGTTGGTC-3'		

IV.3.2. RESULTADOS

a) Sincronización de la actividad locomotora por melatonina.

Los registros de actividad locomotora de un acuario representativo de los grupos control e inyectado con MEL a las 21:00 h se muestran en forma de actogramas de doble representación (izquierda) y periodogramas (derecha) en la Figura 4.8. En la Fase A (correspondiente a la Fase G del experimento anterior), con fotoperiodo 12L:12D y alimentación diaria a las 10:00 h, los carpines de los 2 grupos experimentales mostraron un patrón rítmico de actividad claramente diurno, con periodo de 24 h, y una marcada FAA. Como cabe esperar, la desaparición de ambos zeitgebers (24L y alimentación aleatoria (Fase B) anula dicha ritmicidad en ambos grupos experimentales. La inyección de MEL 5 µg/g durante 15 días (Fase C) induce la aparición de ritmicidad significativa en la actividad locomotora ($\tau = 24,0$ h) (Figura 4.8b), efecto que no se produce en los peces inyectados con salino (Figura 4.8a).

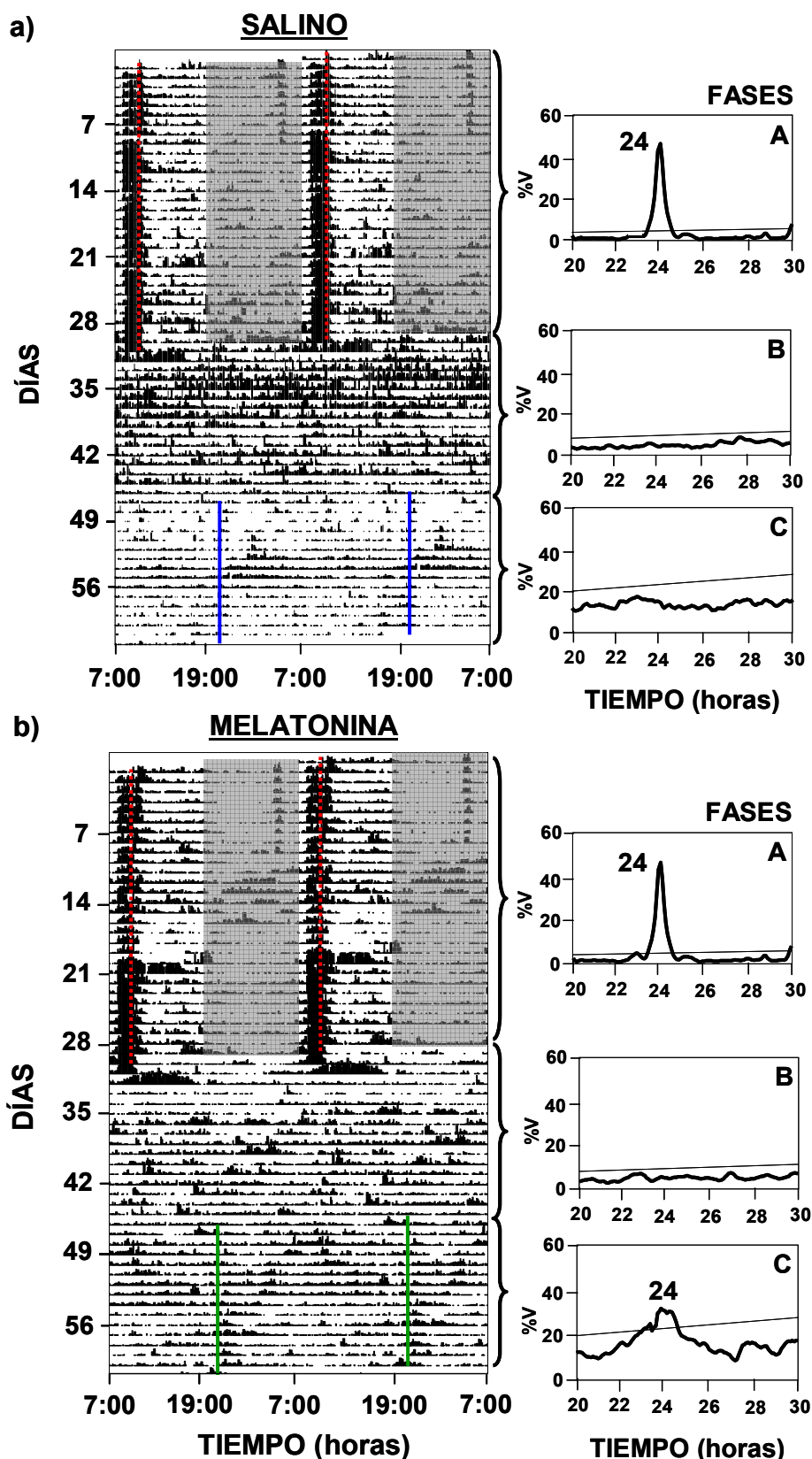


Figura 4.8. Actogramas (izquierda) y periodogramas (derecha) de los carpines inyectados con **a)** salino (10 μ l/g) y **b)** melatonina (5 μ g/g) a las 21:00 h ($n=6$ /grupo). Las fases experimentales (A-C) se describen detalladamente en el diseño experimental. La zona sombreada representa el periodo de oscuridad. La línea roja punteada indica la hora de alimentación en la fase A (10:00 h). Las líneas azul y verde señalan la hora de las inyecciones de salino y melatonina, respectivamente. El número sobre los picos del periodograma indica el valor del periodo.

b) Efecto de la melatonina en la ritmicidad de la expresión de genes reloj.

Los resultados obtenidos se muestran en forma de gráficas, que representan la expresión relativa en función del tiempo circadiano (CT, siendo CT0 la hora de encendido de las luces en los días previos al inicio del procedimiento experimental) y en forma de tablas, que incluyen los parámetros de ajuste a una función sinusoidal (amplitud y la acrofase) de los ritmos diarios de expresión para cada gen.

En las Figuras 4.9 y 4.10 se muestran los niveles diarios de expresión relativa de los genes *per1a*, *per2a*, *per3* y *cry3* en telencéfalo y techo óptico, respectivamente, de los carpines inyectados con solución salina o MEL (5 µg/g) a las 21:00 h. No se observa ritmicidad significativa en la expresión de los genes reloj analizados en los peces inyectados con salino, aunque *per1a* exhibe algunas diferencias entre puntos de muestreo, siendo los valores más altos en CT2 en ambas localizaciones encefálicas. Sin embargo, los peces tratados con MEL presentan ritmos significativos en la expresión de los genes *per1a* y *per3* en telencéfalo y techo óptico, y de *cry3* en el telencéfalo. Todos los genes cuya expresión muestra ritmicidad diaria significativa tienen los niveles máximos durante el día subjetivo (acrofases en torno a CT8), y amplitudes de magnitudes similares (entre 1 y 4) (Figuras 4.9 y 4.10, Tabla 4.2).

Tabla 4.2. Parámetros que definen las funciones sinusoidales teóricas del análisis cosinor a las que se ajustan las variaciones diarias de la expresión de genes reloj en el telencéfalo y el techo óptico de *Carassius auratus*.

GEN	TELENCÉFALO		TECHO ÓPTICO	
	Amplitud (ur)	Acrofase (h)	Amplitud (ur)	Acrofase (h)
<i>per1a</i>	3,04 ± 1,01 [5,82/0,25]	8,83 ± 1,12	4,33 ± 1,46 [8,38/0,29]	8,53 ± 1,1
<i>per3</i>	1,07 ± 0,29 [1,86/0,27]	7,79 ± 0,86	1,7 ± 0,46 [2,98/0,42]	6,84 ± 0,96
<i>cry3</i>	1,25 ± 0,43 [2,43/0,07]	7,58 ± 1,1	—	—

Los datos se representan como estimación ± error estándar de cada parámetro sinusoidal. La amplitud se expresa en unidades de expresión relativa (ur). La acrofase se expresa en tiempo circadiano (horas, h). El intervalo de confianza al 99% se indica entre corchetes. Solo se muestran los parámetros de los ritmos que resultaron ser significativos (test de amplitud cero significativo, $p < 0,005$).

La expresión de *per1a* en telencéfalo y techo óptico muestra una interacción positiva entre los factores hora del día y tratamiento. Además, el tratamiento con MEL retrasa el máximo de expresión diaria respecto a los peces controles inyectados con salino (CT2), sin modificar los valores máximos de expresión génica relativa (Figura 4.9, Tabla 4.2). No se observan variaciones diarias en la expresión de *per2a* ni en el telencéfalo ni en el techo óptico en ninguno de los dos grupos de peces, controles e inyectados con MEL (Figuras 4.9 y 4.10). Sin embargo, encontramos un efecto del tratamiento ($p<0,05$) en la expresión telencefálica de *per2a* (Figura 4.9) y un efecto dependiente de la hora del día ($p<0,05$) en el techo óptico (Figura 4.10). En la expresión del gen *per3* en el telencéfalo influye la hora del día ($p<0,05$) y, ambas variables, hora del día y tratamiento, en el techo óptico ($p<0,05$) (Figuras 4.9 y 4.10).

TELENCÉFALO

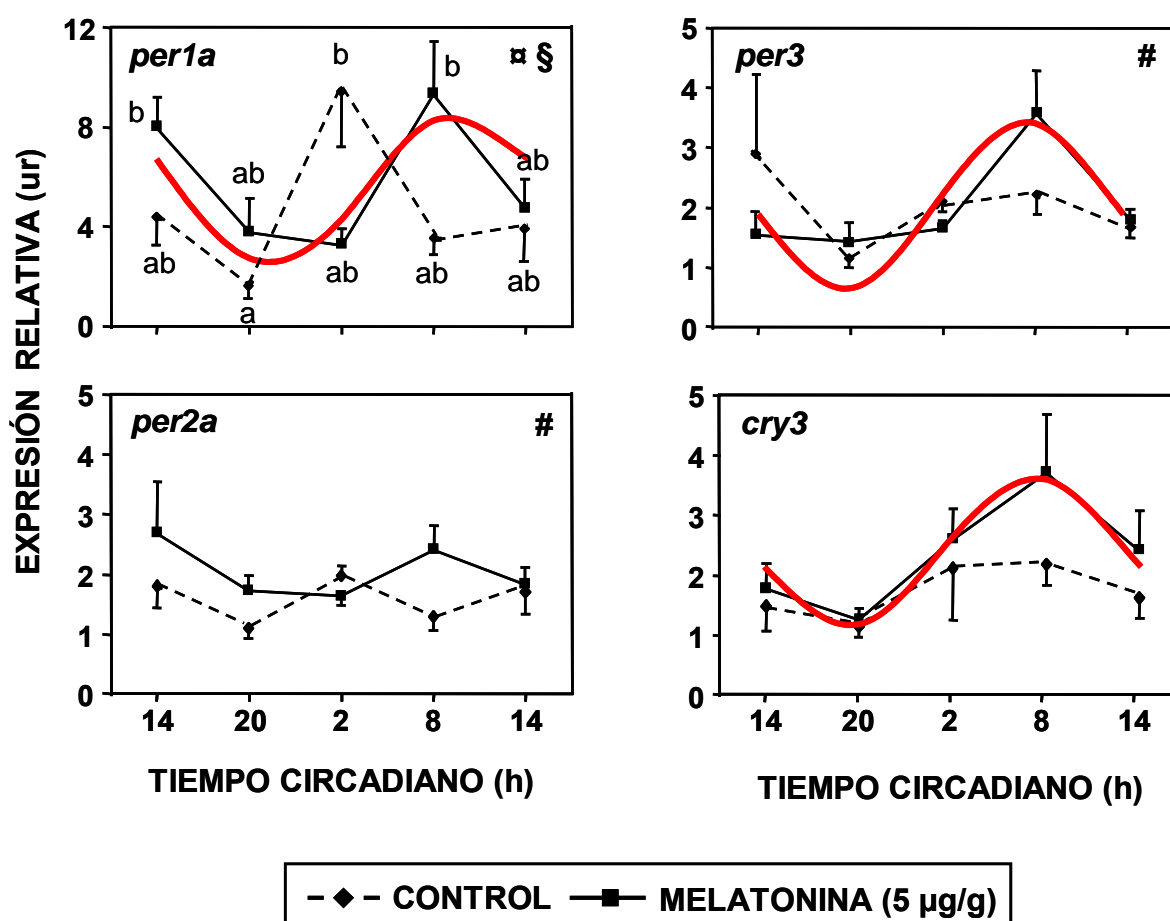
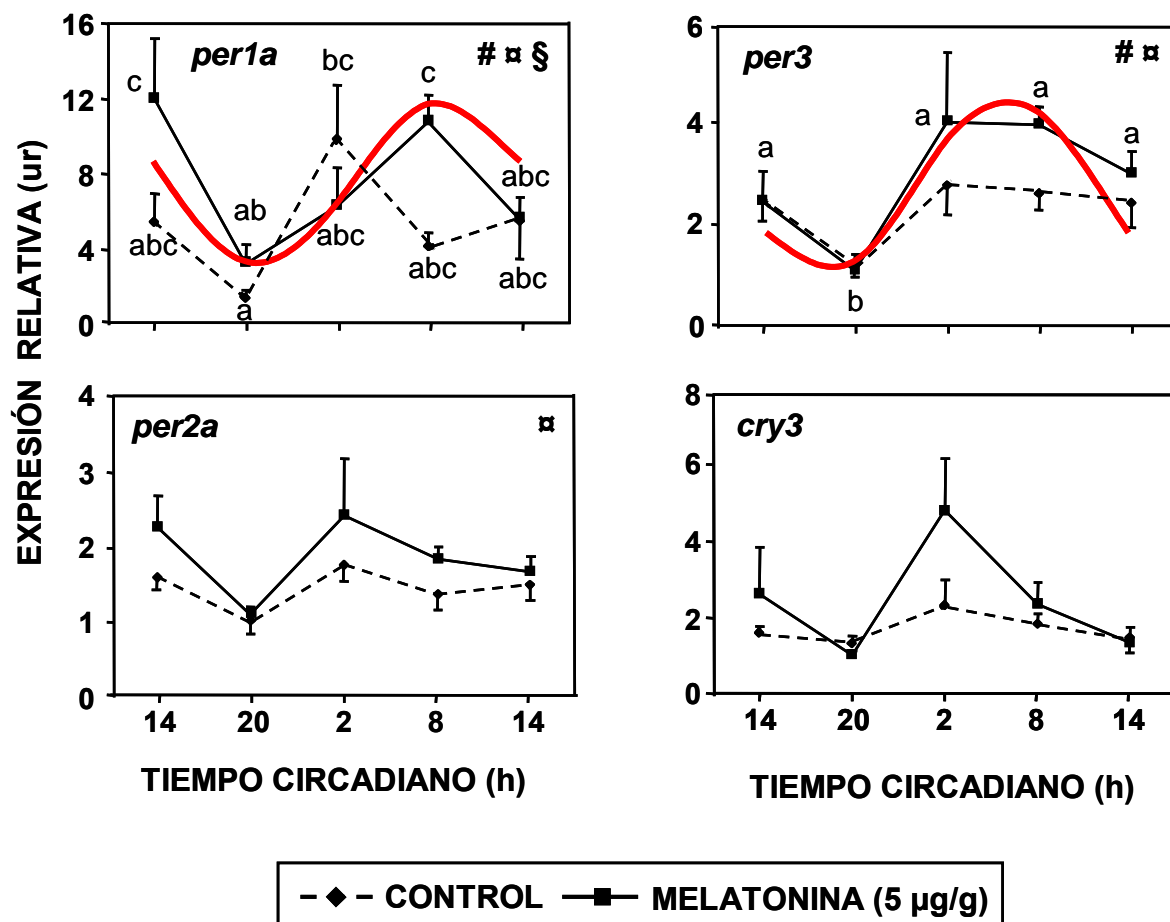


Figura 4.9. Expresión relativa de los genes reloj *per1a*, *per2a*, *per3* y *cry3* en el telencéfalo de carpines inyectados con solución salina (control, 10 µl/g) o melatonina (5 µg/g) a las 21:00 h. Los datos se expresan como la media \pm e.e.m. y se analizaron mediante ANOVA de dos vías considerando las variables hora del día (§: $p<0,05$) y tratamiento (#: $p<0,05$). §: $p<0,05$ para la interacción de los dos factores. Diferentes letras indican diferencias significativas ($p<0,05$). Las líneas rojas muestran las funciones sinusoidales periódicas ajustadas a un ritmo para el grupo tratado con melatonina cuando el análisis cosinor es significativo ($p<0,005$).

TECHO ÓPTICO**c) Efecto de la melatonina en el sistema monoaminérgico.**

La evolución diaria de los sistemas dopaminérgico (DA, L-DOPA y DOPAC), serotoninérgico (5-HT y 5-HIAA) y adrenérgico (adrenalina y noradrenalina) en telencéfalo y techo óptico de carpinos inyectados con solución salina o MEL (5 µg/g) aparece representada en las Figuras 4.11-4.12 (telencéfalo) y 4.13-4.14 (techo óptico).

En el telencéfalo no se observan, en general, diferencias significativas en el sistema de neurotransmisión monoaminérgico entre distintos puntos de muestreo a lo largo de las 24 h, con contenidos en monoaminas muy similares en los peces control y tratados con MEL. Se observa una ritmicidad diaria significativa de baja amplitud en el cociente DOPAC/DA en los peces tratados con MEL (Figura 4.11). Los carpines inyectados con salino presentan variaciones rítmicas diarias de 5-HT en el telencéfalo, con valores más elevados durante la fase diurna subjetiva, que no se observan en los peces inyectados con MEL (Figura 4.12). La hora del día influye significativamente en los niveles de DOPAC ($p < 0,05$) (Figura 4.11).

En el techo óptico encontramos contenidos de monoaminas muy similares a los cuantificados en el telencéfalo, excepto para la NA, la DA y el sistema serotoninérgico, cuyos valores son aproximadamente la mitad. Cabe destacar la existencia de un ritmo significativo en el contenido de DA, que se produce tanto en los peces control como en los inyectados con MEL (Figura 4.13), con valores más elevados durante la fotofase subjetiva, y perfiles sinusoidales muy similares en ambos grupos, como demuestran los valores de amplitudes y acrofases de estos ritmos (Tabla 4.3). Ni el DOPAC ni la L-DOPA muestran ritmicidad, si bien el contenido de L-DOPA en los peces tratados con MEL fluctuó significativamente a lo largo del día, con un perfil similar al de DA, y contenido elevado también durante la fotofase subjetiva, en CT8. La A y NA mantienen perfiles muy similares en los peces control y tratados con MEL sin diferencias significativas a lo largo de las 24 horas. El contenido de 5-HT en el techo óptico, al igual que en el telencéfalo, mostró perfiles rítmicos diarios que resultaron ser estadísticamente significativos en los peces inyectados con MEL, pero no en los controles (Figura 4.14). La amplitud del ritmo es ligeramente inferior a la del telencéfalo, y la acrofase está ligeramente adelantada respecto a la observada para el ritmo de 5-HT en el telencéfalo de los peces controles (Tabla 4.3). El análisis estadístico de la influencia de las variables confirma que la hora del día influye en los contenidos de DA, L-DOPA, 5-HT y 5-HIAA en techo óptico (Figuras 4.13 y 4.14).

Tabla 4.3. Parámetros que definen las funciones sinusoidales teóricas del análisis cosinor a las que se ajustan las variaciones diarias de la cantidad de monoaminas en el telencéfalo y el techo óptico de *Carassius auratus*.

MONOAMINA	TELENCÉFALO		TECHO ÓPTICO	
	Amplitud (ur)	Acrofase (h)	Amplitud (ur)	Acrofase (h)
DA (SAL)	—	—	$0,91 \pm 0,27$ [1,66/0,16]	$7,71 \pm 0,96$
DA (MEL)	—	—	$0,79 \pm 0,24$ [1,46/0,12]	$7,37 \pm 1,00$
DOPAC	—	—	—	—
DOPAC/DA	$1,52 \pm 0,51$ [3/1,9]	$1,78 \pm 1,43$	—	—
5-HT (SAL)	$2,89 \pm 1,03$ [5,76/0,02]	$8,37 \pm 1,19$	—	—
5-HT (MEL)	—	—	$1,49 \pm 0,62$ [2,54/0,43]	$6,91 \pm 1,45$

Los datos se representan como estimación \pm error estándar de cada parámetro sinusoidal. La amplitud se expresa en unidades de expresión relativa (ur). La acrofase se expresa en tiempo circadiano (horas, h). El intervalo de confianza al 99% se indica entre corchetes. Solo se muestran los parámetros de los ritmos que resultaron ser significativos (test de amplitud cero significativo, $p < 0,005$).

Finalmente, cabe indicar que todos los ritmos de monoaminas observados en ambas regiones encefálicas muestran una conservación de fase entre sí y respecto a los observados en la expresión de genes reloj (acrofases en torno a CT8), con excepción del cociente DOPAC/DA telencefálico, que está adelantado (acrofase en torno a CT2), aunque sigue situado en la fotofase subjetiva.

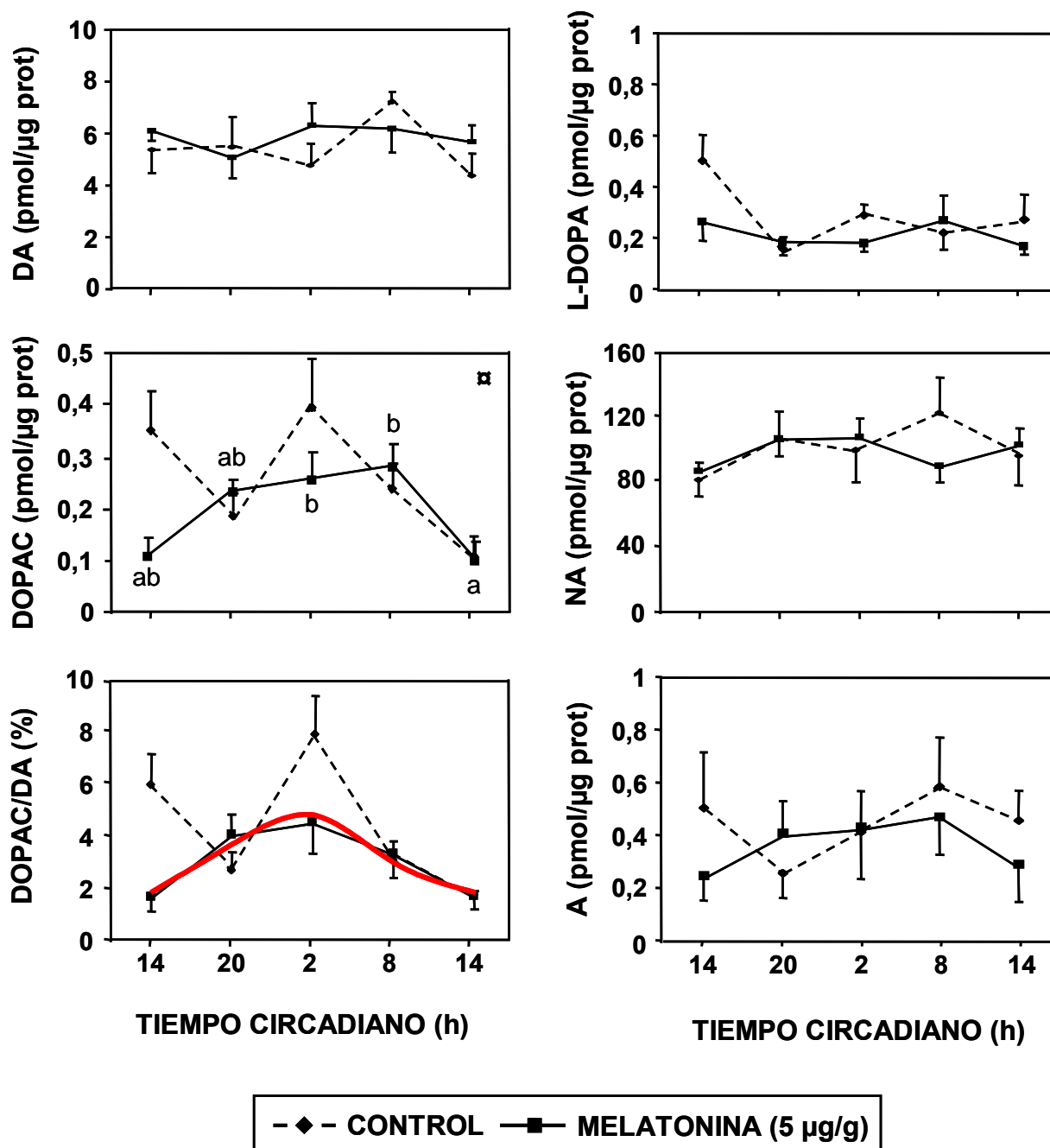
TELENCÉFALO

Figura 4.11. Concentración de L-DOPA, DA, DOPAC, cociente DOPAC/DA, NA y A en el telencéfalo de carpines inyectados con solución salina (control, 10 μl/g) o melatonina (5 μg/g) a las 21:00 h. Los datos se expresan como la media ± e.e.m. y se analizaron mediante ANOVA de dos vías considerando las variables hora del día (α: $p < 0,05$) y tratamiento. Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre horas del día. La línea roja muestra la función sinusoidal periódica ajustada a un ritmo para el grupo tratado con melatonina cuando el análisis cosinor es significativo ($p < 0,005$).

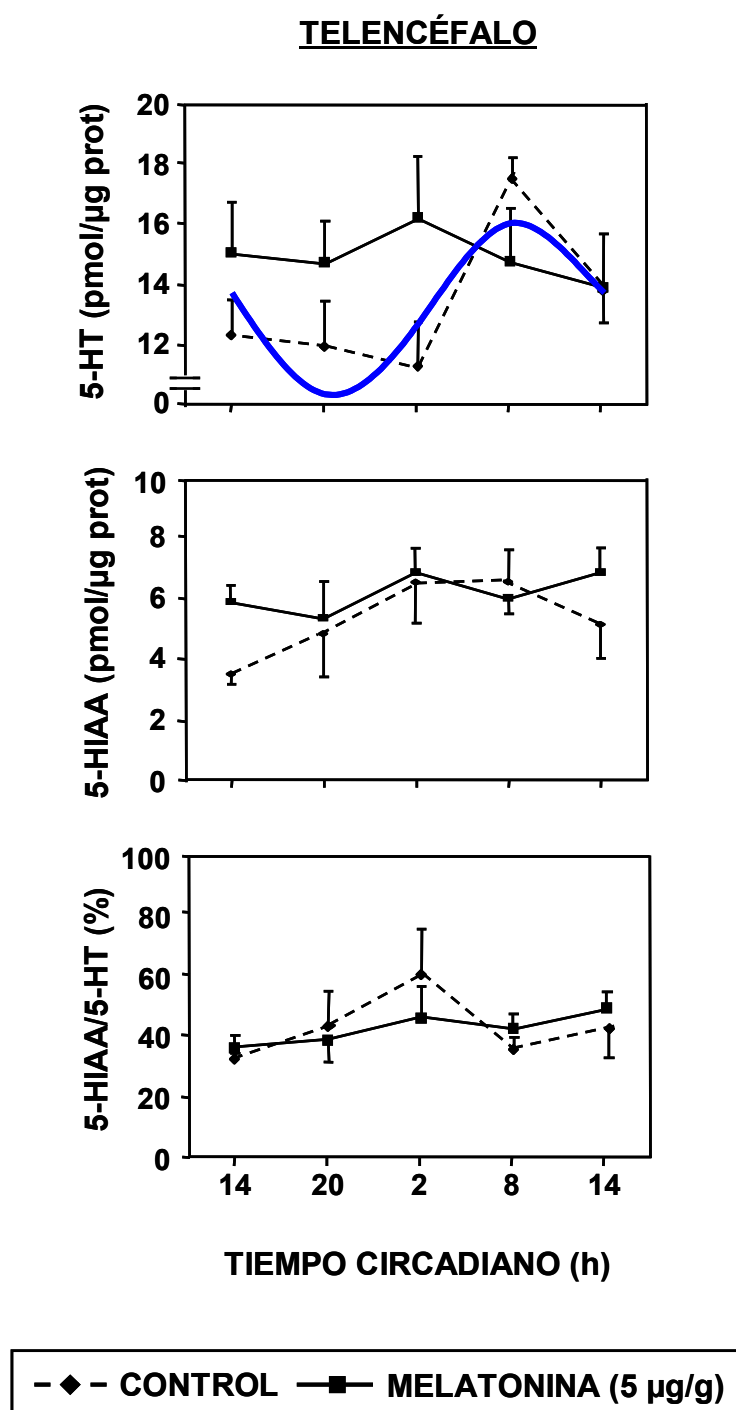


Figura 4.12. Concentración de 5-HT, 5-HIAA y cociente 5-HIAA/5-HT en el telencéfalo de carpines inyectados con solución salina (control, 10 μl/g) o melatonina (5 μg/g) a las 21:00 h. Los datos se expresan como la media ± e.e.m. La línea azul muestra la función sinusoidal periódica ajustada a un ritmo para el grupo control cuando el análisis cosinor es significativo ($p < 0,005$).

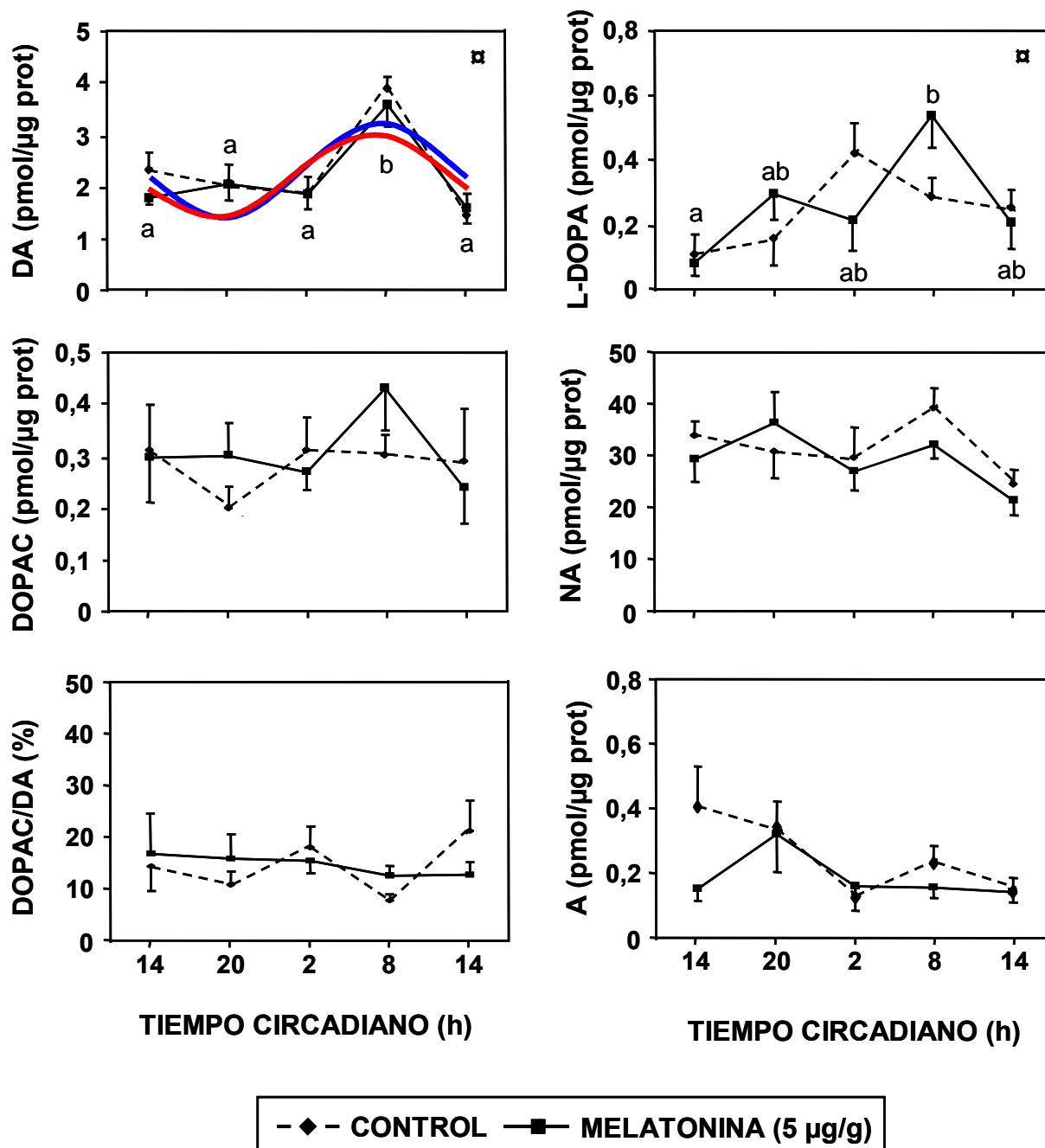
TECHO ÓPTICO

Figura 4.13. Concentración de L-DOPA, DA, DOPAC, cociente DOPAC/DA, NA y A en el techo óptico de carpines inyectados con solución salina (control, 10 μl/g) o melatonina (5 μg/g) a las 21:00 h. Los datos se expresan como la media ± e.e.m. y se analizaron mediante ANOVA de dos vías considerando las variables hora del día (α: $p < 0,05$) y tratamiento. Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre horas del día. Las líneas azul y roja muestran las funciones sinusoidales periódicas ajustadas a un ritmo para el grupo control y el tratado con melatonina, respectivamente, cuando el análisis cosinor es significativo ($p < 0,005$).

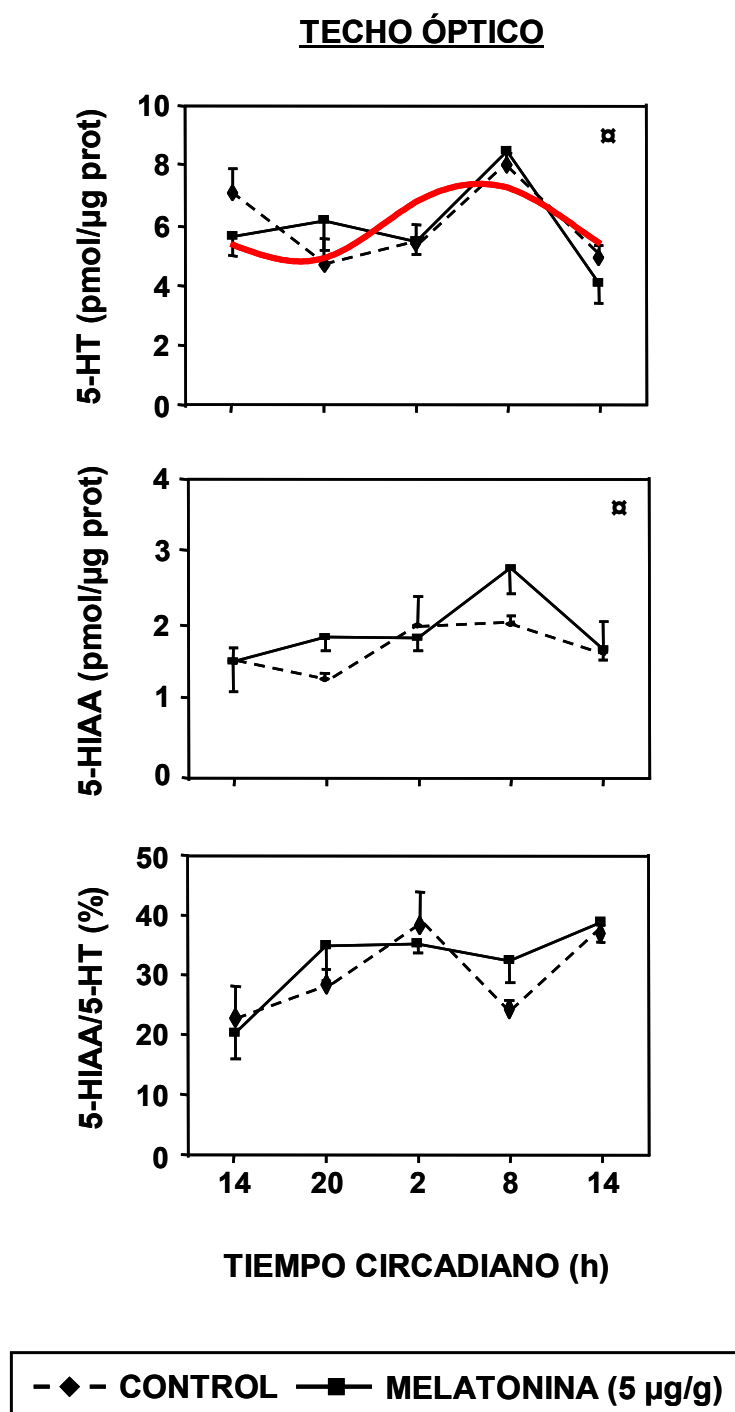


Figura 4.14. Concentración de 5-HT, 5-HIAA y cociente 5-HIAA/5-HT en el techo óptico de carpines inyectados con solución salina (control, 10 μl/g) o melatonina (5 μg/g) a las 21:00 h. Los datos se expresan como la media ± e.e.m. y se analizaron mediante ANOVA de dos vías considerando las variables hora del día (⌘: $p < 0,05$) y tratamiento. La línea roja muestra la función sinusoidal periódica ajustada a un ritmo para el grupo tratado con melatonina cuando el análisis cosinor es significativo ($p < 0,005$).

IV.4. DISCUSIÓN.

Nuestros resultados revelan, por primera vez en los peces, que la MEL exógena sincroniza la actividad locomotora en ausencia de los *zeitgebers* ciclo luz/oscuridad y horario de alimentación cuando es inyectada durante la escotofase subjetiva. En la actualidad se acepta que la secreción nocturna de MEL en los vertebrados es una señal de salida utilizada por el sistema circadiano, cuyo perfil diario puede ser utilizado como señal sincronizadora endógena en la organización temporal circadiana y estacional. En relación con los efectos producidos por la MEL exógena existen numerosos estudios que le adjudican múltiples funciones, siendo los efectos cronobióticos los más demostrados en numerosas especies de vertebrados, incluidos los humanos.

La actividad locomotora es un parámetro comportamental idóneo para el estudio de estas acciones cronobióticas de la MEL, por lo que se ha utilizado como herramienta de estudio en la mayoría de los trabajos realizados en mamíferos y aves. El carpín es un teleósteo que muestra una marcada ritmicidad de sus patrones de actividad locomotora, sobre los que resulta sencillo analizar las respuestas a la exposición a distintos agentes sincronizadores, como el ciclo luz/oscuridad, ciclos de temperatura o el patrón de alimentación (Aranda *et al.*, 2001; Madrid *et al.*, 2001; Sánchez-Vázquez *et al.*, 1997). En condiciones de fotoperiodo 12L:12D y horario de alimentación fijo (como las utilizadas en las fases A y G de nuestro estudio), los carpines exhiben un claro patrón diurno de actividad locomotora, con un ritmo de 24 h (Iigo *et al.*, 1994; Sánchez-Vázquez *et al.*, 1996; Azpeleta *et al.*, 2010; presentes resultados). Esta sincronización al ambiente es un punto de partida adecuado para el desarrollo de nuestro diseño experimental, en el que la retirada de los *zeitgebers* ciclo luz/oscuridad y horario de alimentación (condiciones 24L y alimentación aleatoria) induce la pérdida de esta ritmicidad generando una respuesta comportamental de curso libre. Estos resultados confirman la gran potencia del ciclo luz/oscuridad y de la alimentación como *zeitgebers* en la sincronización del sistema circadiano en general, y de la actividad locomotora en particular en el carpín, tal y como se ha demostrado en otras especies de teleósteos (Sánchez y Sánchez-Vázquez, 2009; Kasai y Kiyohara, 2010).

El papel sincronizador de la MEL ha sido abordado extensamente en los mamíferos, donde se realizó el primer estudio demostrando que la administración de la hormona sincroniza los ritmos de actividad en condiciones de curso libre en la rata (Redman *et al.*, 1983), siendo numerosos los estudios posteriores realizados en roedores (Cassone y Natesan, 1997; Pévet y Challet, 2011) y otros mamíferos, incluidos primates no humanos (Masuda y Zhdanova, 2010) y humanos (Arendt y

Skene, 2005). En las aves, el papel de la MEL como sincronizador también ha sido estudiado extensamente. La administración exógena de la hormona por distintas vías sincroniza los ritmos circadianos de actividad locomotora en passeriformes arrítmicas intactas (Hau y Gwinner, 1994, 1995; Abraham *et al.*, 2000) y pinealectomizadas (Gwinner y Benzinger, 1978; Chabot y Menaker, 1992; Heigl y Gwinner, 1995), lo que ha conducido a la aceptación de que la MEL es una entrada al sistema circadiano de las aves que permite la organización y estabilización del funcionamiento del reloj biológico.

En los vertebrados poiquiloterms el número de estudios realizados es mucho menor, existiendo algunos trabajos en reptiles que confirman este papel de la MEL exógena como sincronizador de la ritmicidad de la actividad locomotora en *Sceloporus occidentalis* intactos (Underwood y Harless, 1985) y pinealectomizados (Hyde y Underwood, 1995), en *Podarcis sicula* (Foa *et al.*, 1992), y en *Anolis carolinensis* (Hyde y Underwood, 2000). En invertebrados sólo encontramos un estudio en el que se sugiere una función de la MEL exógena como regulador circadiano en los insectos (Yamano *et al.*, 2001).

En los peces, aunque existe abundante información previa tanto relacionada con la MEL (síntesis, funciones y ritmicidad) como con la ritmicidad diaria de actividad locomotora (Sánchez-Vázquez *et al.*, 1996; Migaud *et al.*, 2007; Zhdanova *et al.*, 2008; Falcón *et al.*, 2010), aun no se ha investigado el posible papel sincronizador de esta neurohormona en la actividad locomotora de estos vertebrados. La glándula pineal se ha relacionado con los ritmos de actividad locomotora en algunas especies de peces, de forma que la pinealectomía elimina el ritmo ultradiano de actividad en *Couesius plumbeus* (Kavaliers, 1980a) y altera el patrón de actividad en *Catostomus commersoni* (Kavaliers, 1980b), pero no modifica el ritmo de 24 h en condiciones de 12L:12D en *Silurus asotus* (Tabata *et al.*, 1988), ni modula la actividad de boqueo ni su mecanismo de resincronización en *Clarias batrachus* (Yadu y Shedpure, 2002a, 2002b). En el carpín no existen estudios previos sobre los efectos de la pinealectomía en la actividad locomotora, pero en nuestro diseño experimental es previsible que no exista una producción endógena de MEL, ya que la exposición a 24L anula el ritmo diario circulante de esta hormona en esta especie (Iigo *et al.*, 1995). En estas condiciones de ausencia de *zeitgebers* (y posiblemente de ritmicidad de MEL endógena) encontramos una pérdida de ritmicidad en la actividad locomotora, que se recupera con la administración diaria de 1 y 5 µg/g de MEL. Estos resultados indican que la MEL exógena sincroniza el ritmo de actividad en los carpines en condiciones de curso libre, y concuerdan con la hipótesis de que el ritmo circadiano de MEL proporciona una señal sincronizadora interna, que puede estar afectando a uno o

varios osciladores sin identificar hasta el momento, y con los que la actividad locomotora hipotéticamente se encontraría acoplada.

Es importante diferenciar entre una sincronización del reloj biológico y un posible efecto de enmascaramiento de la MEL en la expresión del ritmo de actividad. En el presente estudio, el hecho de que el efecto sincronizador sólo se observe cuando la MEL se administra al inicio de la noche subjetiva (pero no al inicio del día) y la permanencia del efecto de la hormona varios días después de la retirada de las inyecciones descartarían la posibilidad de estar ante un fenómeno de enmascaramiento. La importancia de la hora de administración de MEL se conoce desde hace años por estudios pioneros de Tamarkin y colaboradores (1976) en los que una inyección subcutánea de MEL era suficiente para inducir una respuesta gonadal característica de días cortos en hámsteres aclimatados a días largos, sólo si se administraba al final de la fase luminosa o en una ventana estrecha durante la noche, pero no en otras horas del día. En nuestro estudio, la sincronización de la actividad locomotora por MEL y la recuperación del patrón de actividad, se observan únicamente cuando la administración de la hormona coincide con el momento del aumento endógeno de MEL circulante (Iigo *et al.*, 1994). Nuestros resultados cumplirían el requisito de Aschoff (1965) para poder proponer una verdadera sincronización por un estímulo, en el sentido de que el reloj biológico debe mostrar una sensibilidad dependiente de la hora del día ante un potencial agente estimulador, y coinciden con lo descrito en mamíferos en general, y también en primates y humanos (Lewy *et al.*, 2005; Masuda y Zhdanova, 2010), pero no en algunas especies de aves diurnas, en las que la MEL sincroniza los ritmos de actividad locomotora independientemente del momento del fotociclo en que se administre (Abraham *et al.*, 2000).

Por tanto, a partir de nuestros resultados, proponemos que la MEL endógena puede estar funcionando como un *zeitgeber* interno en el carpín, como se ha sugerido en otros vertebrados, y que la MEL administrada de forma exógena puede actuar como un agente cronobiótico. Inicialmente los efectos cronobióticos de la MEL se describieron en mamíferos reproductores estacionales, principalmente el hámster y la oveja, en los que tratamientos con MEL durante semanas equiparaban los efectos de la exposición a fotoperiodos artificiales en la inducción o supresión de la competencia reproductora estacional (Reiter, 1973). Las numerosas evidencias científicas obtenidas en las últimas décadas en distintas especies, incluidos los humanos, han determinado que en la actualidad la MEL se utilice como fármaco para restaurar una ritmicidad circadiana alterada (Arendt y Skene, 2005). Además de la actividad locomotora general, en aves se ha propuesto que la administración de MEL también puede alterar

la actividad motora relacionada con la ingestión de alimento, con resultados variables (Beldhuis *et al.*, 1988; Lumineau *et al.*, 2002); sin embargo, en teleósteos, como la trucha arco iris, la pinealectomía no afecta a los ritmos de alimentación por autodemanda (Sánchez-Vázquez *et al.*, 2000).

Aparte del efecto sincronizador, la MEL tiene un efecto agudo directo reduciendo la actividad locomotora espontánea en representantes de todas las clases de vertebrados estudiadas, peces (Zhdanova, 2001; López-Olmeda *et al.*, 2006a; Azpeleta *et al.*, 2010), aves (Heigl y Gwinner, 1995; Murakami *et al.*, 2001), y mamíferos (Chuang y Lin, 1994; Zhdanova *et al.*, 1998; Arendt y Skene, 2005), de forma que se puede afirmar que esta neurohormona deprime la actividad locomotora mostrando un cierto efecto inductor del sueño. En el presente estudio también observamos un descenso de la actividad en las horas posteriores a la administración de la hormona, tratándose de un efecto dependiente de la dosis, con una reducción de la actividad locomotora más prolongada al aumentar la dosis de MEL. Resultados previos en el carpín, coincidentes con los presentes, demuestran que una única inyección de MEL es suficiente para generar este efecto agudo sobre la actividad (Azpeleta *et al.*, 2010; López-Olmeda *et al.*, 2006a). Por tanto, cabe plantearse una posible interferencia entre estas dos acciones de la MEL, un efecto circadiano sincronizador, y el efecto agudo reduciendo la actividad. No obstante, en nuestro estudio se observa que tras finalizar el periodo de inyecciones de MEL el efecto agudo desaparece de inmediato, mientras que el patrón de actividad inducido se mantiene durante algunos días, pudiendo diferenciar claramente estos dos efectos que, muy probablemente, estén mediados por distintos mecanismos.

Ante la cuestión de cuáles son los mecanismos de acción que median estos efectos de la MEL, la primera dificultad en la respuesta surge de la propia naturaleza lipófila de la molécula, que permite su difusión rápida por todo el organismo, pudiendo alcanzar prácticamente todas las células. Algunos estudios en homeotermos sugieren que el efecto agudo de la hormona reduciendo la actividad e induciendo el sueño está asociado a un efecto reductor de la temperatura corporal y/o un incremento de la temperatura cutánea, implicando al sistema cardiovascular y/o centros termorreguladores (Hughes y Badia, 1997); sin embargo otros trabajos apoyan una independencia de los efectos de la MEL sobre centros encefálicos vinculados a la termorregulación y centros relacionados con el sueño (Zhdanova, 2005). En los poiquilotermos no existen estudios previos que investiguen los mecanismos subyacentes a estos efectos de la MEL. El hecho de que el efecto de la MEL sincronizando el ritmo de actividad en el carpín sea dependiente de la dosis (presentes resultados), sugiere que estaría mediado por receptores específicos. En este sentido,

varios estudios en peces han descrito la existencia de receptores para MEL tanto en localizaciones centrales (López-Patiño *et al.*, 2008; Iigo *et al.*, 1997, 2003) como periféricas (López-Patiño *et al.*, 2012), que podrían estar mediando los efectos agudos de la MEL, si bien las dosis suprafisiológicas utilizadas en el carpín, al igual que en mamíferos (Slotten *et al.*, 2000), pueden sugerir la implicación de otros mecanismos neurales adicionales a la activación de receptores específicos.

Numerosos estudios realizados con distintos enfoques experimentales han evidenciado que los efectos cronobióticos de la MEL exógena en los mamíferos se producen a través de una acción directa a nivel del reloj principal, que en estos vertebrados es el NSQ hipotalámico. Desde hace más de una década se conocen dos efectos distintos de la MEL en el NSQ, un efecto inhibitor agudo sobre su tasa de disparo neuronal, y un efecto de cambio de fase en su ritmo de actividad eléctrica (Liu *et al.*, 1997), implicando distintos mecanismos celulares en ambos casos (Pévet y Challet, 2011). El NSQ de los mamíferos posee receptores de MEL de alta afinidad (Hunt *et al.*, 2001), y en algunas especies se ha descrito la existencia de una ventana de sensibilidad a la MEL exógena durante el crepúsculo, datos que refuerzan la propuesta de que la MEL puede estar actuando como una entrada al sistema circadiano de los mamíferos a través de su reloj principal. La organización circadiana de los peces, como ya se ha indicado previamente en esta Memoria, no posee esta jerarquía de relojes, sino que es un sistema formado por múltiples osciladores situados a nivel central y periférico con una fuerte interconexión funcional entre ellos (Cahill, 2002; Falcón *et al.*, 2010; Feliciano *et al.*, 2011), de modo que no es posible asimilar un nivel equivalente al NSQ sobre el que pueda estar actuando la MEL exógena para generar una sincronización observable, al menos en términos de actividad locomotora. Por otro lado, en las aves se ha propuesto un mecanismo por el cual la MEL puede afectar tanto a la expresión del ritmo de actividad como al oscilador circadiano, a través de la regulación de la síntesis de 7- α -hidroxipregnenolona, factor clave en la inducción de actividad locomotora en aves diurnas (Tsutsui *et al.*, 2008). En la actualidad se ignora si este neuroesteroide está implicado en la actividad locomotora en los peces. Desafortunadamente, a pesar del importante grado de conocimiento actual de las bases neurales de la locomoción en los vertebrados (Grillner *et al.*, 2008), aún se desconoce cómo el sistema circadiano puede controlar los ritmos de actividad locomotora.

Conociendo el efecto inhibitor del apetito descrito para la MEL en el carpín (Pinillos *et al.*, 2001; López-Olmeda *et al.*, 2006a), cabría esperar una cierta pérdida de peso tras el tratamiento con la hormona como consecuencia de su efecto en la movilización de reservas musculares y hepáticas (De Pedro *et al.*, 2008). Sin embargo,

en nuestro estudio no se observan diferencias en la ganancia de peso corporal entre los distintos grupos experimentales. Esta aparente discrepancia puede justificarse además de por la menor dosis de MEL inyectada en el presente estudio, por las importantes diferencias entre diseños experimentales. Asimismo, debemos tener presente que junto al efecto sincronizador de la actividad locomotora puede haberse generado también sincronización de otros ritmos fisiológicos, vinculados a procesos digestivos/absortivos (Conde-Sieira *et al.*, 2012b), de forma que la posible reducción de ganancia de peso corporal inducida por MEL pueda verse compensada con una optimización metabólica lograda por la sincronización. Un razonamiento similar puede aplicarse en relación con los niveles de cortisol circulantes, que en determinadas condiciones experimentales se reducen por el tratamiento con MEL (Azpeleta *et al.*, 2010), pero que en el presente diseño experimental, en condiciones de curso libre, son muy similares en todos los grupos, mostrando apenas una ligera reducción (no significativa) en los peces inyectados con MEL a las 21:00 h.

En el análisis de los mecanismos subyacentes al efecto sincronizador de la MEL en la actividad locomotora del carpín hemos investigado dos aspectos en el techo óptico y el telencéfalo del carpín, por un lado los ritmos de expresión de los genes reloj, núcleo central del funcionamiento de los relojes biológicos, y por otro la posible ritmicidad de la neurotransmisión monoaminérgica. En teleósteos, varios estudios señalan al techo óptico como componente del sistema circadiano, habiéndose descrito ritmos diarios en la expresión de genes reloj en esta región encefálica (Feliciano *et al.*, 2011), y altas densidades de sitios de unión a MEL en varias especies, incluyendo el carpín (López-Patiño *et al.*, 2008; Herrera-Pérez, 2009; Ikegami *et al.*, 2009a). Además, se ha encontrado coexpresión del ARNm del gen *clock* y de receptores de MEL en el techo óptico de la trucha arco iris (Mazurais *et al.*, 2000). Por todo ello, esta región encefálica es considerada un enlace funcional entre la percepción de la información visual y la integración de la información fotoperiódica vía MEL. En el presente estudio se utilizó también el telencéfalo, teniendo presente la equivalencia de los núcleos telencefálicos de los teleósteos con el estriado de los mamíferos (Davis y Kassel, 1983; Wullmann y Rink, 2002), siendo además un área relacionada, entre otras funciones, con la actividad locomotora en estos vertebrados (Lerner y Kreitzer, 2011). En el telencéfalo de peces, además, se ha descrito la existencia de sitios de unión de alta afinidad para MEL (López-Patiño *et al.*, 2008).

En el diseño experimental realizado se obtuvo una respuesta comportamental muy similar a la observada en el primer diseño. En condiciones 12L:12D y horario fijo de alimentación, los peces muestran un patrón de actividad diurno, con un ritmo de 24

h ($\tau = 24$ h), que desaparece al ser expuestos a condiciones de curso libre (24L y alimentación aleatoria). La inyección de MEL a las 21:00 h restaura el ritmo diario de actividad locomotora con un periodo de 24 h ($\tau = 24$ h). Estos resultados confirman el papel de la MEL exógena en la sincronización del ritmo de actividad locomotora en el carpín en condiciones de curso libre.

En carpines con patrones arrítmicos de actividad locomotora encontramos una ausencia de ritmicidad de la expresión de genes reloj en el techo óptico, resultados que confirman estudios previos de nuestro grupo en esta misma especie (Feliciano *et al.*, 2011), y extienden esta respuesta también al telencéfalo. En el presente estudio, el tratamiento con MEL induce la aparición de un ritmo significativo en la expresión de *per1a*, *per3* y *cry3* en las áreas encefálicas estudiadas. La relación de fase encontrada entre el ritmo de actividad locomotora diurno y los ritmos diarios en la expresión de genes reloj, con acrofases en la fotofase subjetiva, sugiere una posible relación funcional entre ambas. No existen estudios previos en este sentido en los peces, pero en mamíferos también se ha demostrado esta relación de fase entre el ritmo de actividad locomotora y el patrón de expresión en el NSQ de los genes reloj pertenecientes a la familia *period*. Así, se han observado relaciones de fase entre *per* y el patrón de actividad en especies diurnas (*Spermophilus* y *Arvicanthis*), con acrofases de *per1* y *per2* durante el día subjetivo, coincidiendo con el periodo activo (Mrosovsky *et al.*, 2001; Caldelas *et al.*, 2003; Lambert *et al.*, 2005). En cambio, en roedores nocturnos esas relaciones de fase son opuestas, como en el ratón, donde el mRNA de *per1* en el NSQ se induce rápidamente por la luz en correlación con la actividad locomotora, y en la rata, cuyo ritmo de actividad también parece estar dirigido por los marcapasos que, en la corteza parietal y en el caudado-putamen, regulan la expresión de *per1*, *per2* y *bmal1* (Masubuchi *et al.*, 2000). Por tanto, además del NSQ, cuya sincronización a la luz clásicamente ha estado asociada a incrementos de *per1* y *per2*, otras áreas encefálicas también pueden estar implicadas (Shieh *et al.*, 2005).

Nuestros resultados revelan, por primera vez en los peces, que la MEL exógena induce ritmicidad de *per1a*, *per3* y *cry3* en el telencéfalo, y de *per1a* y *per3* en el techo óptico, sin modificar los valores medios de expresión relativa respecto a los peces controles, lo que permite descartar que los cambios observados en la expresión se atribuyan a alteraciones de la vida media y/o de la estabilidad de los ARNm inducidas por el tratamiento con MEL. Esta hormona es uno de los agentes reguladores de la expresión de genes reloj más estudiados, bien mediante aproximaciones endógenas (pinelectomías y uso de animales modificados genéticamente) o con la administración de MEL exógena (Masubuchi *et al.*, 2000; Von Gall *et al.*, 2002; Poirel *et al.*, 2003; Imbesi *et al.*, 2009). Una de las principales dianas

de los efectos de la MEL en la regulación de los genes reloj en los mamíferos es la *pars tuberalis*, considerada reloj periférico en su sistema circadiano, clave en la mediación de los efectos estacionales de la MEL y con una elevada densidad de receptores para esta hormona (Jilg *et al.*, 2005; Von Gall *et al.*, 2002). La delección del gen que codifica para el receptor Mel1a en ratones produce una disminución del ARNm de *cry1*, *clock*, y *bmal1* (Von Gall *et al.*, 2005), en la *pars tuberalis*. La administración exógena de MEL al final del día subjetivo produce acciones opuestas en la expresión de *per1* y *cry1*, disminuyendo el ARNm de *per1* en la *pars tuberalis* del hámster (Messenger *et al.*, 2000), e induciendo el de *cry1* en la rata (Dardente *et al.*, 2003). En otros vertebrados, únicamente existe información disponible en aves, donde no hay resultados claros de una implicación de la MEL en la expresión de genes reloj. En la codorniz japonesa (*Coturnix coturnix japonica*) la MEL exógena no modifica la expresión de *per2*, *per3* y *clock* (Yasuo *et al.*, 2002), y la pinealectomía del gorrión (*Passer domesticus*) tampoco altera la ritmicidad de *per2* en el NSQ (Abraham *et al.*, 2003).

En el control de la expresión de los genes reloj, se acepta que los genes *period*, elementos negativos del oscilador circadiano, son la base de la sincronización por la luz, y nuestros resultados en el carpín apoyan la propuesta de que pueden ser la diana clave para el efecto cronobiótico de la MEL. Numerosos estudios en mamíferos revelan una relación funcional entre la MEL y la expresión de *per1*, con acrofases diurnas de este gen en la *pars tuberalis* de oveja y hámster tras el descenso de la MEL circulante, y una total ausencia tanto del mensajero como de la proteína en ratones genéticamente deficientes en MEL (Von Gall *et al.*, 2002, 2005). Además, la expresión de *per1* pierde su ritmicidad en el estriado y en la *pars tuberalis* del hámsteres y ratones pinealectomizados (Messenger *et al.*, 2001; Von Gall *et al.*, 2002; Uz *et al.*, 2003), por lo que la importancia de este gen se extiende a distintas regiones del encéfalo, al igual que hemos encontrado en el carpín. En la actualidad desconocemos el mecanismo intracelular que regula la expresión de *per1* por MEL, aunque en ratones se ha propuesto que la expresión rítmica de algunos genes hipofisarios, entre ellos *per1*, estaría regulada por un activador y un inhibidor del AMPc (Von Gall *et al.*, 2002), proponiendo a la MEL como candidato a desempeñar el papel inhibidor. Esta acción podría llevarse a cabo a través de receptores MT1, tal y como se propone en el estriado de ratones (Imbesi *et al.*, 2009).

La expresión de *per3*, al igual que la de *per1*, también parece estar conducida por un oscilador circadiano, tanto en el carpín (Feliciano *et al.*, 2011), como en el pez cebra, donde conserva la ritmicidad *in vivo* bajo condiciones de luz y oscuridad constantes tanto en tejidos centrales como periféricos (Kaneko *et al.*, 2006),

habiéndose propuesto (junto a *per1*) como elemento clave en la sincronización al ciclo de luz/oscuridad (Pando *et al.*, 2001; Vatine *et al.*, 2011). Sin embargo, no hemos encontrado estudios previos relacionados con un posible efecto de la MEL en la expresión de este gen reloj. El hecho de que el ritmo de expresión de *per3* inducido por MEL se encuentre en fase con el de *per1* en telencéfalo y techo óptico del carpín (acrofases situadas entre 17 y 19 h tras la administración de MEL) resulta esperable, teniendo en cuenta que ambos genes (y *cry3* también) forman parte del mismo bucle negativo de funcionamiento de los genes reloj. Además, la sincronización de sus ritmos de expresión con la inyección de MEL puede estar indicando la existencia de un reloj dependiente de esta hormona localizado en estas áreas encefálicas de este teleósteo. Por otro lado, que la expresión de genes reloj inducida por MEL esté en fase en el telencéfalo y el techo óptico sugiere que ambas estructuras encefálicas pueden actuar de forma coordinada en la generación de las salidas rítmicas del reloj, como por ejemplo la actividad locomotora.

Las amplitudes de los ritmos de estos genes inducidos por el tratamiento con MEL son de un orden de magnitud similar entre sí, pero menor a las descritas previamente en otras especies de peces, y en el propio carpín, en presencia de los *zeitgebers* luz/oscuridad y horario de alimentación (Park *et al.*, 2007; Davie *et al.*, 2009; Feliciano *et al.*, 2011). Si bien es cierto que estamos ante diseños experimentales completamente distintos, la comparación de las amplitudes de los ritmos encontrados en el presente estudio con los generados, por ejemplo, en la sincronización por el horario de alimentación (Feliciano *et al.*, 2011) puede estar indicando que el efecto de la MEL, en ausencia de información fotoperiódica, resulta menos potente que otros *zeitgebers* no fóticos, como el horario de alimentación.

En relación a *cry3* no se han encontrado estudios previos que analicen el efecto de la MEL sobre su ritmo de expresión en ningún vertebrado. Sin embargo, el paralelismo mostrado con *per1a* y *per3* en el presente estudio, y su expresión rítmica a nivel central (Velarde *et al.*, 2009a; Feliciano *et al.*, 2011) y periférico inducida por la alimentación en el carpín (Feliciano *et al.*, 2011) sugiere que *cry3* actúa conjuntamente con *per1a* y *per3* en la restauración de la ritmicidad. No obstante, su menor amplitud, tanto en techo óptico como en telencéfalo, puede estar indicando una menor robustez, y por tanto un papel más secundario, al menos en la sincronización por MEL. La expresión de *per2*, su sincronización y el inicio de su ritmicidad circadiana son estrictamente dependientes de la luz en el pez cebra (Cahill, 2002; Kaneko *et al.*, 2006; Vatine *et al.*, 2009), y en el carpín (Feliciano *et al.*, 2011), pero no es modificada por el tratamiento con MEL (presentes resultados), por lo que parece existir un desacoplamiento funcional con *per1* y *per3*. De forma similar a nuestros resultados, la

administración de MEL tampoco modifica la expresión de *per2* en la hipófisis de ratón (Von Gall *et al.*, 2005). Finalmente, no podemos ignorar otros genes, no estudiados en el presente trabajo, que también interaccionan en la construcción de la oscilación rítmica circadiana. Por ejemplo, en mamíferos se ha propuesto como dianas potenciales para el efecto cronobiótico de la MEL a ROR β y REV-ERB α , que activan y reprimen, respectivamente, la expresión de *bmal1* (Pévet y Challet, 2011), así como a otros receptores nucleares huérfanos relacionados (Agez *et al.*, 2007).

La regulación de la actividad locomotora se ha estudiado desde distintos enfoques en los mamíferos, identificando varios sistemas de neurotransmisores en sus fundamentos fisiológicos. Aún a pesar de que el conocimiento de los mecanismos neurales que controlan la actividad natatoria en los peces es mucho más limitado, parece que el sistema monoaminérgico también está implicado en el control e integración de su ritmicidad. De hecho, la distribución y organización de los sistemas dopaminérgico y serotoninérgico en teleósteos parece ser similar a la descrita en los mamíferos, sugiriendo que las rutas monoaminérgicas implicadas en el control de la actividad locomotora en los mamíferos podrían también regular esta actividad en los teleósteos, tratándose, por tanto, de mecanismos muy conservados.

Los somas neuronales y fibras dopaminérgicas en los mamíferos están ampliamente distribuidos por todo el encéfalo (Meek, 1994). En los peces, aun siendo muy inferior el nivel de conocimiento de las vías neurales implicadas en el control motor, se ha sugerido que núcleos telencefálicos ventrales, alcanzados por aferencias dopaminérgicas procedentes del diencefalo (Wullimann y Rink, 2002), pueden corresponderse con el estriado de los mamíferos, asumiendo su funcionalidad (Davis y Kassel, 1983; Wullimann y Rink, 2002). Estudios funcionales utilizando agonistas dopaminérgicos, como la apomorfina, incrementan la actividad locomotora en dos especies del género *Oreochromis* (Mok y Munro, 1998), tratándose de una acción específica bloqueada por la adición al agua de antagonistas dopaminérgicos. También se ha implicado a mecanismos dopaminérgicos en la acción estimuladora del GABA sobre la actividad locomotora de salmones (*Oncorhynchus shawytscha*) (Clements y Schreck, 2004). Los contenidos de DA, L-DOPA y DOPAC cuantificados en el presente estudio en el carpín son de un orden de magnitud similar a los descritos en estudios previos en hipotálamo de tenca (De Pedro *et al.*, 1998a), y de carpín (De Pedro *et al.*, 2001), y en hipotálamo e hipófisis de trucha (Hernández-Rauda y Aldegunde, 2002), no habiendo encontrado datos previos en las regiones encefálicas analizadas en otras especies de peces. No obstante, hay que tener presente que los sistemas de neurotransmisión dopaminérgica, y también serotoninérgica, muestran importantes variaciones dependiendo no solo de la región encefálica estudiada, la

especie, la edad y el tamaño del pez, sino también del estado nutricional, la estación del año y el momento del ciclo diario en que se realiza el muestreo (De Pedro *et al.*, 1998a, 2001; Hernández-Rauda y Aldegunde, 2002).

En ausencia de *zeitgebers*, los carpines control, que presentan una actividad locomotora arrítmica, tampoco tienen un ritmo diario en el contenido de DA en el telencéfalo, pero sí en el tecto óptico (con valores más elevados durante la fotofase subjetiva), lo que indica una regulación diferente de la ritmicidad de la neurotransmisión dopaminérgica en estas dos regiones encefálicas, y posiblemente también una implicación diferente en la ritmicidad locomotora en esta especie. Estudios previos en peces describen fluctuaciones diarias en el contenido de DA y sus metabolitos en el cerebro completo de la anguila europea (Le Bras, 1979) y del lábrido de tres manchas, *Halichoeres trimaculatus* (Takemura *et al.*, 2010), en hipotálamo de *Channa punctatus* y de la tenca (Khan y Joy, 1988; De Pedro *et al.*, 1998a), en hipotálamo e hipófisis de la trucha arco iris (Hernández-Rauda *et al.*, 2000), y en distintas regiones encefálicas del bacalao, *Gadus morhua* (Ehrenström y Johansson, 1987), pero su relación con la ritmicidad de la actividad locomotora aún no se ha definido. Así, mientras que Le Bras (1979) afirma que la fluctuación diaria de DA cerebral está relacionada con la actividad locomotora en una especie nocturna, como la anguila europea, esto no sucede en cerebro completo del lábrido de tres manchas, que es una especie diurna (Takemura *et al.*, 2010). En cambio, en el bacalao, especie diurna, se ha publicado un patrón bifásico con dos picos diarios de DA en el telencéfalo, lóbulos ópticos e hipotálamo (Ehrenström y Johansson, 1987). A partir de los escasos estudios existentes, podemos afirmar que no parece existir un patrón rítmico diario de DA consistente con la actividad locomotora, encontrando situaciones muy variables dependiendo de la especie investigada.

La gran mayoría de los estudios publicados en otros vertebrados corresponden a mamíferos, excepto alguno puntual en aves en el que no se encuentran variaciones entre los niveles a medio día y media noche en ninguno de los sistemas de neurotransmisión analizados (dopaminérgico, adrenérgico y serotoninérgico) en varias regiones encefálicas (Siuciak *et al.*, 1992). En los mamíferos, la ritmicidad diaria del sistema dopaminérgico se ha investigado sobre todo en la rata (Smith *et al.*, 1992; Schade *et al.*, 1993; Paulson y Robinson, 1994; Shieh *et al.*, 1997), donde se han descrito cambios diarios en la actividad dopaminérgica en distintas regiones encefálicas con diferencias en el patrón diario dependiendo, al igual que sucede en el carpín, de la región estudiada (Shieh *et al.*, 1997). De forma general, la actividad dopaminérgica neuronal muestra altos niveles nocturnos asociados a la actividad locomotora en la rata, aunque existen diferencias entre regiones, por ejemplo el

DOPAC y la L-DOPA son menores al final de la fase luminosa y al comienzo de la fase oscura del fotociclo diario en la eminencia media, pero son mayores durante la noche que durante el día en el estriado (Shiet *et al.*, 1997). Los resultados publicados en relación con la alteración de esta ritmicidad tras la retirada del *zeitgeber* ciclo luz/oscuridad también son muy variados, en unos casos las diferencias diarias en DOPAC y L-DOPA se pierden en 24L en ciertas regiones cerebrales de la rata (Shieh *et al.*, 1997), mientras que en otros el ritmo circadiano de DA y DOPAC no se anula en 24L, pero sí en 24D, en el estriado y núcleo accumbens (Castañeda *et al.*, 2004). Estos resultados sugieren que la regulación del ritmo diario en la neurotransmisión dopaminérgica varía también dependiendo del área cerebral estudiada, al igual que encontramos en el presente estudio en el carpín.

La relación entre MEL y DA se ha puesto de manifiesto en aspectos funcionales muy variados, como la regulación de la ritmicidad funcional en la retina, en la regulación de la secreción de prolactina, en el tratamiento de patologías relacionadas con el movimiento en humanos (Zisapel, 2002), e incluso en procesos de conductas adictivas inducidas por psicoestimulantes (Sircar, 2000). De todos ellos, es en la regulación de la ritmicidad ocular donde los resultados publicados son más consistentes, apoyando las acciones inhibitorias mutuas de ambas, DA y MEL, que actuarían como “análogos químicos” del día y la noche en la retina de los vertebrados, incluido el carpín (Dubocovich, 1983; Tosini y Dirden, 2000; Cahill, 2002; Doyle *et al.*, 2002; Iuvone *et al.*, 2010). En nuestro estudio encontramos que el tratamiento con MEL afecta al sistema dopaminérgico telencefálico, induciendo la aparición de un ritmo diario de baja amplitud en el contenido de DOPAC y de la tasa de recambio de DA, sin afectar al sistema dopaminérgico en el techo óptico. Estos resultados confirman nuestra hipótesis de una regulación diferencial del sistema dopaminérgico en distintas regiones encefálicas del carpín, y apuntan a un posible papel sincronizador de la MEL en la ritmicidad dopaminérgica diaria en el telencéfalo.

La influencia de la MEL en la neurotransmisión dopaminérgica en los peces ha sido muy poco investigada y con resultados poco concluyentes que señalan diferencias de efecto en función de la duración del tratamiento con la hormona. Así, el tratamiento agudo con MEL disminuye la actividad tirosina hidroxilasa en el telencéfalo del pez gato (Chaube y Joy, 2002), el metabolismo dopaminérgico en cerebro del lábrido de tres manchas (Takemura *et al.*, 2010), y el DOPAC hipotalámico y la tasa DOPAC/DA en la hipófisis de la trucha arco iris (Hernández- Rauda *et al.*, 2000). Sin embargo, una administración repetida de MEL no modifica la tasa de recambio de DA en hipotálamo del teleosteo *Heteropneustes fossilis* (Senthilkumaran y Joy, 1995), y los implantes de MEL durante 5 meses incrementan los niveles de expresión génica de

la tirosina hidroxilasa en el telencéfalo/área preóptica y en diencéfalo/mesencéfalo de la anguila europea (Sébert *et al.*, 2008). A partir de estos resultados, obtenidos con diseños experimentales muy diferentes, no es posible esclarecer el papel de la MEL en el control de la actividad dopaminérgica y su metabolismo en el encéfalo, habiéndose llegado a sugerir, además, la influencia del estado de desarrollo gonadal (Takemura *et al.*, 2010). En los mamíferos se han publicado resultados que apoyan una relación MEL/DA en distintas regiones encefálicas, principalmente en el estriado, si bien los distintos modelos experimentales utilizados no permiten extraer sólidas conclusiones generales. Así, una inyección de MEL inhibe significativamente la síntesis diurna de DA en la eminencia media de hámsteres ovariectomizados (Alexiuk y Vriend, 1991), pero incrementa la actividad tirosina hidroxilasa en el estriado de ratas y hámsteres (Joo *et al.*, 1998; Alexiuk y Vriend, 2007), con un efecto sinérgico de MEL y DA en la regulación de la respuesta motora (Escames *et al.*, 1996). La inyección de MEL durante la tarde, pero no al principio de la fase luminosa restaura la ritmicidad diaria de DOPAC y DA anulada con la exposición a 24L en el estriado de rata (Shieh *et al.*, 1997). Una inyección intranigral de MEL en ratones también reduce la liberación de DA al sistema estriatal, observándose una inhibición de la actividad locomotora (Hamdi, 1998). Por otro lado, la pinealectomía anula la ritmicidad de DA y DOPAC en el estriado de ratones en condiciones de luz/oscuridad, mientras que la administración de MEL, aunque disminuye el contenido de DA y aumenta el de DOPAC, restaura ambas ritmicidades (Khaldy *et al.*, 2002), lo que apoyaría la participación de esta indolamina en la sincronización del ritmo diario de DA. Sin embargo, con técnicas de microdiálisis, la perfusión con MEL no altera los ritmos diarios de DA, DOPAC y ácido homovanílico en la rata (Márquez de Prado *et al.*, 2000).

En un intento de explicar los mecanismos que subyacen a esta regulación de la ritmicidad diaria dopaminérgica se ha sugerido que las neuronas hipotálamicas que sintetizan DA en las aves son fotosensibles, estando los cambios de fase de su actividad dopaminérgica influidos directamente por la luz (El Halawani *et al.*, 2009). Se podría hipotetizar que la actividad dopaminérgica telencefálica en el carpín puede ser regulada por la MEL, como señal dependiente de la luz, al igual que se propuso para la retina (Cahill, 1996). Por otro lado, puesto que la principal vía de metabolismo de la DA en el carpín genera DOPAC, el hallazgo en el telencéfalo de un ritmo significativo de este metabolito inducido por el tratamiento con MEL apuntaría a que la hormona podría estar regulando el metabolismo de la DA en esta región encefálica a través de un efecto sobre la monoamino oxidasa. A favor de esta propuesta se ha demostrado en la rata que la MEL incrementa los niveles de esta enzima (Moreno *et al.*, 1992). En apoyo de estas acciones de la MEL en la neurotransmisión dopaminérgica se ha

descrito expresión de receptores de MEL (MT1) en neuronas dopaminérgicas estriatales en roedores (Uz *et al.*, 2005), y acciones directas de esta hormona en la funcionalidad de los receptores dopaminérgicos (Sumaya, 2004). No obstante, también se ha implicado a otros neurotransmisores, como el GABA, en el efecto de la MEL sobre los niveles de DA (Tenn y Niles, 1997).

La neurotransmisión serotoninérgica es clave en la organización funcional del sistema circadiano de los mamíferos (Smith *et al.*, 2008), actuando como elemento esencial en la sincronización de relojes circadianos a través de su acción moduladora del reseteo inducido tanto por la luz como por sincronizadores no fóticos (Challet y Pévet, 2003). El NSQ recibe proyecciones serotoninérgicas procedentes del rafe, cuya activación está estrechamente correlacionada con el inicio de la actividad locomotora (Jacobs *et al.*, 1990). Asimismo, se ha descrito que los niveles de 5-HT en el NSQ siguen el patrón diario de actividad locomotora, tanto en mamíferos nocturnos (Poncet *et al.*, 1993), como en los diurnos (Challet, 2007). En los peces apenas existe información que relacione la ritmicidad del sistema serotoninérgico con la actividad locomotora. Además, el sistema serotoninérgico está claramente implicado en el control del eje HPI en estos vertebrados, de modo que la exposición a distintas situaciones de estrés incrementa la tasa de recambio cerebral de 5-HIAA/5-HT (Øverli *et al.*, 1999), como índice de activación de este sistema de neurotransmisión, y en correlación con los aumentos de cortisol y alteraciones en la ingestión de alimento como respuesta a dicho estrés (Øverli *et al.*, 2001). En nuestro estudio en el carpín no hemos encontrado diferencias ni en el cortisol circulante ni en la ingesta y el peso corporal entre grupos, por lo que podemos afirmar que las condiciones experimentales aplicadas no han generado una situación de estrés en los peces, pudiendo descartar que los cambios observados en la neurotransmisión serotoninérgica se deban a alteraciones secundarias derivadas de dicho hipotético estrés.

Aunque la serotonina muestra ritmicidad diaria en la pineal, como precursor de la síntesis rítmica diaria de MEL (Falcón *et al.*, 2010), las posibles variaciones diarias en la neurotransmisión serotoninérgica encefálica son mucho más cuestionadas, y dependen de forma importante de múltiples factores, siendo la alimentación y el ciclo reproductor algunos de los más estudiados en los peces. En el carpín encontramos un ritmo diario de 5-HT en el telencéfalo y el techo óptico siendo significativo sólo en el primer caso. En este sentido, es importante considerar que la ausencia de significación estadística en oscilaciones diarias rítmicas puede deberse a una heterogeneidad de acrofases y amplitudes entre individuos, llegando a generar una importante dispersión de los datos que llegue a ocultar posibles diferencias significativas. No existen estudios previos que apoyen de forma sólida la existencia de ritmos diarios en la

neurotransmisión serotoninérgica encefálica en los peces, si bien algunos trabajos describen cambios estacionales, como en el hipotálamo de la tenca (Guijarro, 2004), y en el telencéfalo, pero no en el hipotálamo e hipófisis, del pargo amarillo, *Lutjanus argentiventris* (Hernández-Rauda y Aldegunde, 2002), ni en cerebro completo del lábrido de tres manchas (Takemura *et al.*, 2010). Algunos de estos trabajos relacionan la neurotransmisión serotoninérgica con el ciclo reproductor anual (Ebbesson *et al.*, 1996; Hernández-Rauda y Aldegunde, 2002), pero no con la ritmicidad de actividad locomotora, excepto un estudio en *Oncorhynchus kisutch*, que describe incrementos significativos de 5-HT y 5-HIAA durante su periodo migratorio (Ebbesson *et al.*, 1996).

En el techo óptico, los perfiles de 5-HT en los dos grupos experimentales son similares, si bien las diferencias encontradas de los peces tratados con MEL determinan un ritmo significativo, sin afectar en ningún caso ni al metabolito principal, 5-HIAA, ni a la tasa de recambio (5-HIAA/5-HT). No existen estudios anteriores que hayan investigado esta cuestión en los peces. La primera indicación de una relación entre la MEL y las neuronas serotoninérgicas fue publicada por Anton-Tay y colaboradores (1968), que encontraron un aumento de los niveles de 5-HT en distintas regiones encefálicas de la rata, tras la administración intraperitoneal de MEL, resultado confirmado posteriormente en el pollo (Cassone *et al.*, 1986). En la década de los 90 los resultados publicados mostraron una mayor variedad de respuestas en los mamíferos. La MEL de forma aguda disminuye la liberación de 5-HT en el hipotálamo, estriado y núcleo accumbens (Chuang y Lin, 1994), también disminuye la recaptura de 5-HT en la pineal (Míguez *et al.*, 1995), y modula la liberación en el hipocampo (Monnet, 2002). Sin embargo, el tratamiento crónico con MEL incrementa significativamente los niveles de 5-HT en distintas regiones encefálicas (Ueda *et al.*, 2008) y revierte de forma significativa el déficit inducido por la edad, mejorando la transmisión serotoninérgica en el estriado (Esteban *et al.*, 2010). Esta disparidad de respuestas puede justificarse en base a diferencias entre los tratamientos aplicados. A diferencia de nuestros resultados en peces, la MEL en la rata modifica la tasa de recambio de 5-HT en algunas áreas encefálicas (Míguez *et al.*, 1996; Yoshioka *et al.*, 2000); sin embargo la pinealectomía no altera el ritmo de 5-HT (Míguez *et al.*, 1997), concordando con los presentes resultados en el carpín. En definitiva, a partir de nuestros resultados podemos afirmar que en la sincronización de la actividad locomotora inducida por MEL en el carpín no parece estar implicada la neurotransmisión serotoninérgica, y los estudios actuales en mamíferos tampoco parecen apoyar esta posibilidad de forma rotunda.

Los resultados obtenidos en relación con el contenido de adrenalina y noradrenalina no parecen involucrar a estos neurotransmisores en el efecto

sincronizador de la MEL, ni apuntan a una ritmicidad diaria de los mismos, al menos en las regiones encefálicas analizadas. Tampoco hemos encontrado información alguna en relación con esta posibilidad ni en peces ni en otros vertebrados.

En resumen, los resultados de este capítulo muestran por primera vez en peces que la MEL exógena puede actuar como un sincronizador del ritmo de actividad locomotora diaria en ausencia de los *zeitgebers* ciclo luz/oscuridad y horario de alimentación, y sugieren la existencia de una sensibilidad diaria para esta acción de esta hormona. La sincronización de la expresión de *per1a* y *per3* en telencéfalo y techo óptico, y de *cry3* en telencéfalo inducida por MEL, puede sugerir su participación en la ritmicidad locomotora. Aunque la MEL exógena modula la ritmicidad circadiana en la neurotransmisión dopaminérgica en telencéfalo y techo óptico, y serotoninérgica en techo óptico, nuestros resultados no nos permiten establecer una relación clara, en las regiones encefálicas estudiadas, entre la sincronización de los ritmos de actividad locomotora por melatonina y la ritmicidad monoaminérgica.

V. CONCLUSIONES / CONCLUSIONS

A partir de los resultados presentados y discutidos en la presente Memoria, proponemos las siguientes conclusiones:

1. Las expresiones rítmicas diarias de los genes reloj analizados en los tres niveles que constituyen el eje HPI (hipotálamo, hipófisis y tejido interrenal), cuyos perfiles temporales de expresión concuerdan con el mecanismo general de funcionamiento de los relojes biológicos, permiten sugerir la existencia de osciladores funcionales en cada una de estas localizaciones, que constituirían posibles nodos en la red del sistema circadiano del carpín. Estos osciladores no parecen dirigir la transcripción rítmica de ciertos genes funcionales del eje HPI, si bien no podemos descartar posibles regulaciones alternativas a niveles post-transcripcionales.
2. La melatonina ejerce un efecto periférico reductor de la actividad locomotora en el carpín, tanto tras su administración aguda como crónica. Dicha reducción afecta a ambas actividades, diurna y nocturna, y a la actividad anticipatoria al alimento. Por tanto, proponemos a esta hormona como un regulador fisiológico de la actividad locomotora en los peces, confirmando un alto grado de conservación de esta función en la filogenia de los vertebrados. El hecho de que una situación de restricción alimentaria en el carpín no modifique su actividad locomotora, indica que la reducción de la actividad natatoria observada tras la administración de melatonina no parece ser una consecuencia de la acción anorexigénica inducida por esta indolamina.
3. La exposición de los carpines a los modelos de estrés agudo utilizados en esta Tesis Doctoral genera una respuesta anorexigénica y un incremento significativo de los niveles de cortisol circulante, principal indicador de la respuesta primaria al estrés en los peces, por lo que los protocolos aplicados pueden considerarse como modelos de estrés agudo eficaces en este teleósteo. La administración intraperitoneal de melatonina revierte tanto el incremento del cortisol plasmático como la anorexia inducidos por la exposición a estrés, señalando a la hormona como un posible agente anti-estrés en el carpín y corroborando su efecto relajante.
4. El rápido aumento del cortisol plasmático inducido por la exposición a un estrés agudo en el carpín no parece depender de una activación inmediata de la transcripción de genes funcionales del eje HPI, a excepción de *star*, sugiriendo

una movilización de posibles reservas de los elementos activadores del eje a fin de generar dicha respuesta esteroideogénica. La reducción del cortisol plasmático a tiempos cortos inducida por el tratamiento con melatonina no parece deberse a cambios en la expresión de genes funcionales del eje HPI, si bien los resultados obtenidos permiten sugerir al tejido interrenal como diana para esta acción de la melatonina.

5. La melatonina *in vitro* reduce la producción y/o liberación de cortisol a través de una acción directa sobre el tejido interrenal estimulado con ACTH en las dos especies de teleósteos estudiadas: el carpín y la trucha arco iris. El hecho de que este efecto se observe a concentraciones fisiológicas de melatonina y que esté mediado por receptores específicos sugiere que podría tratarse de una acción fisiológica de esta hormona *in vivo*.
6. La melatonina administrada de manera crónica actúa como sincronizador de los ritmos diarios de actividad locomotora en carpines mantenidos en ausencia de los *zeitgebers* ciclo luz/oscuridad y horario de alimentación. Esta respuesta se observa únicamente cuando la hormona se administra al inicio de la escotofase subjetiva, pero no cuando se inyecta al inicio de la fotofase, lo que sugiere la existencia de una sensibilidad diaria a la acción cronobiótica de la melatonina.
7. El tratamiento crónico con melatonina, en ausencia de los *zeitgebers* ciclo luz/oscuridad y horario de alimentación, sincroniza la expresión de los genes reloj *per1a*, *per3* y *cry3* en el telencéfalo y el techo óptico del carpín, lo que sugiere que la acción cronobiótica de esta hormona en la actividad locomotora puede producirse de forma directa sobre los osciladores moleculares presentes en ambos tejidos. El tratamiento con melatonina también induce una sincronización en el contenido de serotonina, dopamina y la tasa de recambio de dopamina en telencéfalo y techo óptico, si bien nuestros resultados no permiten establecer una relación clara entre los efectos de la melatonina en la ritmicidad monoaminérgica diaria y la sincronización de la actividad locomotora.

From the results shown and discussed in the present Thesis, we suggest the following conclusions:

1. The daily rhythmic expressions of the clock genes analysed at the three levels of the HPI axis (hypothalamus, pituitary and interrenal tissue), with profiles according to the general functioning of the biological clocks, lead to suggest the existence of functional oscillators in each one of these locations, that would constitute possible nodes in the network of the goldfish circadian system. These oscillators do not seem to drive the rhythmic transcription of certain HPI axis functional genes, although alternative regulations at different post-transcriptional levels cannot be discarded.
2. Melatonin exerts a peripheral reductive effect of locomotor activity in goldfish, after acute and chronic administration. Such reduction affects both activities, diurnal and nocturnal, and food anticipatory activity. Therefore, we propose this hormone as a physiological regulator of locomotor activity in fish, supporting a high conservation of this function in vertebrate phylogeny. The fact that food restriction does not modify locomotor activity in goldfish indicates that the activity reduction observed after melatonin administration does not seem to be a consequence of the indoleamine-induced anorectic action.
3. The acute stress models used in this PhD Thesis produce an anorectic response, and a significant increment of circulating cortisol, the main indicator of primary stress response in fish. Therefore, the applied protocols could be considered as effective models of acute stress in this teleost. Intraperitoneal administration of melatonin counteracts both the increment of plasma cortisol and the anorexia induced by exposure to stress, pointing to the hormone as an anti-stress agent in goldfish and confirming its relaxing effect.
4. The rapid increase of plasma cortisol induced by an acute stress in goldfish does not seem to depend on an immediate activation of HPI axis functional genes transcription, except for *star*, suggesting the mobilization of stores of the activators of the axis to generate such steroidogenic response. Short-term plasma cortisol reduction induced by melatonin treatment does not seem to be due to changes in the expression of HPI axis functional genes, but obtained results allow suggesting interrenal tissue as a target for this action of melatonin.

5. Melatonin *in vitro* reduces the production and/or release of cortisol by a direct action on the ACTH-stimulated interrenal tissue in the two teleosts studied: goldfish and rainbow trout. This effect is observed at physiological concentrations of melatonin and is mediated by specific receptors, suggesting that this could be a physiological action of this hormone *in vivo*.
6. Chronically administered melatonin acts as a synchronizer of daily locomotor activity rhythms in goldfish maintained in the absence of both light/dark cycle and feeding time *zeitgebers*. This response is only observed when the hormone is administered at the beginning of the subjective scotophase, but not when it is injected at the beginning of the photophase, proposing the existence of a daily sensitivity to the chronobiotic action of melatonin.
7. Chronic treatment with melatonin, in the absence of light/dark cycle and feeding time *zeitgebers*, synchronizes the expression of clock genes *per1a*, *per3* and *cry3* in the telencephalon and the optic tectum, suggesting that the chronobiotic action of this hormone on locomotor activity can be exerted directly on the molecular oscillators in both tissues. Melatonin treatment also induces an entrainment of serotonin and dopamine content as well as dopamine turnover in telencephalon and optic tectum, although our results do not let us establish a clear relationship between melatonin effects on brain monoaminergic daily rhythmicity and locomotor activity synchronization.

VI. BIBLIOGRAFÍA

- ABRAHAM, U., GWINNER, E., VAN'T HOF, T.J. (2000) Exogenous melatonin reduces the resynchronization time after phase shifts of a nonphotic *zeitgeber* in the house sparrow (*Passer domesticus*). *J. Biol. Rhythms* **15**:48-56.
- ABRAHAM, U., ALBRECHT, U., BRANDSTÄTTER, R. (2003) Hypothalamic circadian organization in birds. II. Clock gene expression. *Chronobiol. Int.* **20**:657-669.
- ADAM, T.C., EPEL, E.S. (2007) Stress, eating and the reward system. *Physiol. Behav.* **91**:449-458.
- AGEZ, L., LAURENT, V., PÉVET, P., MASSON-PÉVET, M., GAUER, F. (2007) Melatonin affects nuclear orphan receptors mRNA in the rat suprachiasmatic nuclei. *Neuroscience* **144**:522-530.
- AGHA, A.K., JOY, K.P. (1989) Effect of pinealectomy on the histology of the adrenocortical homologue and plasma cortisol level in the Indian catfish, *Heteropneustes fossilis* (Bloch). *J. Pineal. Res.* **6**:335-340.
- AGUILERA, G., NIKODEMOVA, M., WYNN, P.C., CATT, K.J. (2004) Corticotropin releasing hormone receptors: two decades later. *Peptides* **25**:319-329.
- AGULLEIRO, M.J., ROY, S., SÁNCHEZ, E., PUCHOL, S., GALLO-PAYET, N., CERDÁ-REVERTER, J.M. (2010) Role of melanocortin receptor accessory proteins in the function of zebrafish melanocortin receptor type 2. *Mol. Cell. Endocrinol.* **320**:145-152.
- ALEXIUK, N.A., VRIEND, J. (1991) Effects of daily afternoon melatonin administration on monoamine accumulation in median eminence and striatum of ovariectomized hamsters receiving pargyline. *Neuroendocrinology* **54**:55-61.
- ALEXIUK, N.A., VRIEND, J. (2007) Melatonin: effects on dopaminergic and serotonergic neurons of the caudate nucleus of the striatum of male Syrian hamsters. *J. Neural Transm.* **114**:549-554.
- ALSOP, D., VIJAYAN, M.M. (2009) Molecular programming of the corticosteroid stress axis during zebrafish development. *Comp. Biochem. Phys. A* **153**:49-54.
- ALURU, N., VIJAYAN, M.M. (2006) Aryl hydrocarbon receptor activation impairs cortisol response to stress in rainbow trout by disrupting the rate-limiting steps in steroidogenesis. *Endocrinology* **147**:1895-1903.
- ALURU, N., VIJAYAN, M.M. (2008) Molecular characterization, tissue-specific expression, and regulation of melanocortin 2 receptor in rainbow trout. *Endocrinology* **149**:4577-4588.
- ALURU, N., VIJAYAN, M.M. (2009) Stress transcriptomics in fish: a role for genomic cortisol signaling. *Gen. Comp. Endocrinol.* **164**:142-150.
- ANDREWS, R.V. (1971) Circadian rhythms in adrenal organ cultures. *Gegenbaurs Morphol. Jahrb.* **117**:89-98.
- ANSURUDEEN, I., KOPPRASCH, S., EHRHART-BORNSTEIN, M., WILLENBERG, H.S., KRUG, A.W., FUNK, R.H., BORNSTEIN, S.R. (2006) Vascular-adrenal niche-endothelial cell mediated sensitization of human adrenocortical cells to angiotensin II. *Horm. Metab. Res.* **38**:476-480.

- ANTON-TAY, F., CHOU, C., ANTON, S., WURTMAN, R. (1968) Brain serotonin concentration: elevation following intraperitoneal administration of melatonin. *Science* **162**:277-278.
- APARICIO, S., GARAU, C., NICOLAU, M.C., RIAL, R.V., ESTEBAN, S. (2006) Opposite effects of tryptophan intake on motor activity in ring doves (diurnal) and rats (nocturnal). *Comp. Biochem. Phys. A* **144**:173-179.
- ARAI, M., ASSIL, I.Q., ABOU-SAMRA, A.B. (2001) Characterization of three corticotropin-releasing factor receptors in catfish: a novel third receptor is predominantly expressed in pituitary and urophysis. *Endocrinology* **142**:446-454.
- ARANDA, A., MADRID, J.A., SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, F.J. (2001) Influence of light on feeding anticipatory activity in goldfish. *J. Biol. Rhythms* **16**:50-57.
- ARENDS, R.J., VAN DER GAAG, R., MARTENS, G.J.M., WENDELAAR BONGA, S.E., FLIK, G. (1998) Differential expression of two pro-opiomelanocortin mRNAs during temperature stress in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *J. Endocrinol.* **159**:85-91.
- ARENDS, R.J., MANCERA, J.M., MUÑOZ, J.L., WENDERLAAR BONGA, S.E., FLIK, G. (1999) The stress response of the gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) to air exposure and confinement. *J. Endocrinol.* **163**:149-157.
- ARENDT, J. (1999) Jet-lag and shift work: therapeutic use of melatonin. *J. Roy. Soc. Med.* **92**:402-405.
- ARENDT, J., SKENE, D.J. (2005) Melatonin as a chronobiotic. *Sleep Med. Rev.* **9**:25-39.
- ARTEMENKO, I.P., ZHAO, D., HALES, D.B., HALES, K.H., JEFEOATE, C.R. (2001) Mitochondrial processing of newly synthesized steroidogenic acute regulatory protein (StAR), but not total StAR, mediates cholesterol transfer to cytochrome P450 side chain cleavage enzyme in adrenal cells. *J. Biol. Chem.* **276**:46583-46596.
- ASCHOFF, J. (1965) Response curves in circadian periodicity. En: *Circadian clocks*. Aschoff, J. (Ed.). North-Holland Publishing, Ámsterdam. pp. 95-111.
- ASCHOFF, J. (1981) A survey of biological rhythms. En: *Handbook of behavioral neurobiology*. Aschoff, J. (Ed.). Plenum Press, Nueva York. pp. 3-10.
- AZPELETA, C., MARTÍNEZ-ÁLVAREZ, R.M., ISORNA, E., DELGADO, M.J., DE PEDRO N. (2010) Melatonin reduces locomotor activity and circulating cortisol in goldfish. *Horm. Behav.* **57**:323-329.
- BACKSTRÖM, T., SCHJOLDEN, J., ØVERLI, Ø., THÖRNQVIST, P.-O., WINBERG, S. (2011) Stress effects on AVT and CRF systems in two strains of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) divergent in stress responsiveness. *Horm. Behav.* **59**:180-186.
- BALM, P.H.M., POTTINGER, T.G. (1995) Corticotrope and melanotrope POMC-derived peptides in relation to interrenal function during stress in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Gen. Comp. Endocrinol.* **98**:279-288.

- BALSALOBRE, A., BROWN, S.A., MARCACCI, L., TRONCHE, F., KELLEDOCK, C., REICHARDT, H.M., SCHÜTZ, G., SCHIBLER, U. (2000) Resetting of circadian time in peripheral tissues by glucocorticoid signalling. *Science* **289**:2344-2347.
- BARCELLOS, L.J.G., NICOLAIEWSKY, S., DE SOUZA, S.M.G., LULHIER, F. (1999) Plasmatic levels of cortisol in the response to acute stress in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), previously exposed to chronic stress. *Aquac. Res.* **30**:437-444.
- BARCELLOS, L.J.G., KREUTZ, L.C., QUEVEDO, R.M., FIOREZE, I., CERICATO, L., SOSO, A.B., FAGUNDES, M., CONRAD, J., BALDISSERA, R.K., BRUSCHI, A., RITTER, F. (2004) Nursery rearing of jundiá, *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard) in cages: cage type, stocking density and stress response to confinement. *Aquaculture* **232**:383-394.
- BARCELLOS, L.J.G., KREUTZ, L.C., QUEVEDO, R.M. (2005) Previous chronic stress does not alter the cortisol response to an additional acute stressor in jundiá (*Rhamdia quelen*, Quoy and Gaimard) fingerlings. *Aquaculture* **253**:317-321.
- BARON, A., VEO, K., ANGLESON, J., DORES, R.M. (2009) Modeling the evolution of the MC2R and MC5R genes: studies on the cartilaginous fish, *Heterodontus francisci*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **161**:13-19.
- BARTON, B.A. (2002) Stress in fishes: a diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. *Integr. Comp. Biol.* **42**:517-525.
- BARTON, B. A., IWAMA, G. K. (1991) Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Annu. Rev. Fish Dis.* **1**:3-26.
- BARTON, B.A., SCHRECK, C.B., FOWLER, L.G. (1988) Fasting and diet content affect stress-induced changes in plasma glucose and cortisol in juvenile Chinook salmon. *Prog. Fish-Cult.* **50**:16-22.
- BARTON, B.A., RAHN, A.B., FEIST, G., BOLLIG, H., SCHRECK C.B. (1998) Physiological stress responses of the freshwater chondrosteian paddlefish (*Polyodon spathula*) to acute physical disturbances. *Comp. Biochem. Phys. A* **120**:355-363.
- BARTON, B.A., MORGAN, J.D., VIJAYAN, M.M. (2002) Physiological and condition-related indicators of environmental stress in fish. En: *Biological indicators of aquatic ecosystem stress*. Adams, S.M. (Ed.). American Fisheries Society, Bethesda.
- BAYARRI, M.J., MUÑOZ-CUETO, J.A., LÓPEZ-OLMEDA, J.F., VERA, L.M., ROL DE LAMA, M.A., MADRID, J.A., SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, F.J. (2004) Daily locomotor activity and melatonin rhythms in Senegal sole (*Solea senegalensis*). *Physiol. Behav.* **81**:577-583.
- BELANGER, J.M., SON, J.H., LAUGERO, K.D., MOBERG, G.P., DOROSHOV, S.I., LANKFORD, S.E., CECHE JR., J.J. (2001) Effects of short-term management stress and ACTH injections on plasma cortisol levels in cultured white sturgeon, *Acipenser transmontanus*. *Aquaculture* **203**:165-176.

- BELDHUIS, H.J.A., DITTAMI, J.P., GWINNER, E. (1988) Melatonin and the circadian rhythms of feeding and perch-hopping in the European starling, *Sturnus vulgaris*. *J. Comp. Physiol. A* **164**:7-14.
- BENTLEY, P.J. (2002) Endocrines and osmoregulation. A comparative account in vertebrates. En: *Zoophysiology*. Bradshaw, S.D., Burggren, W., Heller, H.C., Ishii, S., Langer, H., Neuweiler, G., Randall, D.J. (Eds.). Springer, Berlín. pp. 187-231.
- BENYASSI, A., SCHWARTZ, C., DUCOURET, B., FALCÓN, J. (2001) Glucocorticoid receptors and serotonin N-acetyltransferase activity in the fish pineal organ. *Neuroreport* **12**:889-892.
- BERNIER, N.J. (2006) The corticotropin-releasing factor system as a mediator of the appetite-suppressing effects in fish. *Gen. Comp. Endocrinol.* **146**:45-55.
- BERNIER, N.J., PETER, R.E. (2001a) The hypothalamic pituitary interrenal axis and the control of food intake in teleost fish. *Comp. Biochem. Phys. B* **129**:639-644.
- BERNIER, N.J., PETER, R.E. (2001b) Appetite-suppressing effects of urotensin I and corticotropin-releasing hormone in goldfish (*Carassius auratus*). *Neuroendocrinology* **73**:248-260.
- BERNIER, N.J., CRAIG, P.M. (2005) CRF-related peptides contribute to stress response and regulation of appetite in hypoxic rainbow trout. *Am. J. Physiol. R* **289**:982-990.
- BERNIER, N.J., LIN, X., PETER, R.E. (1999) Differential expression of corticotropin-releasing factor (CRF) and urotensin I precursor genes, and evidence of CRF gene expression regulated by cortisol in goldfish brain. *Gen. Comp. Endocrinol.* **116**:461-477.
- BERNIER, N.J., BEDARD, N., PETER, R.E. (2004) Effects of cortisol on food intake, growth, and forebrain neuropeptide Y and corticotropin-releasing factor gene expression in goldfish. *Gen. Comp. Endocrinol.* **135**:230-240.
- BERNIER, N.J., FLIK, G., KLAREN, P.H.M. (2009) Regulation and contribution of the corticotropic, melanotropic and thyrotropic axes to the stress response in fishes. En: *Fish neuroendocrinology*. Vol. 28. Bernier, N.J., van der Kraak, G., Farrell, A.P., Brauner, C.J. (Eds.). Academic Press. pp. 236-311.
- BLOM, S., FÖRLIN, L., ANDERSSON, T.B. (2001) Characterisation of head kidney and liver microsomal 17-hydroxyprogesterone 21-hydroxylase activity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and the lack of regulatory effects of ACTH. *Fish Physiol. Biochem.* **24**:1-8.
- BORNSTEIN, S.R., CHROUSOS, G.P. (1999) Adrenocorticotropin (ACTH)-and non-ACTH-mediated regulation of the adrenal cortex: neural and immune inputs. *J. Clin. Endocr. Metab.* **84**:1729-1736.
- BORNSTEIN, S.R., ENGELAND, W.C., EHRHART-BORNSTEIN, M., HERMAN, J.P. (2008) Dissociation of ACTH and glucocorticoids. *Trends Endocrin. Met.* **19**:175-180.
- BOUJARD, T., LEATHERLAND, J.F. (1992) Circadian rhythms and feeding time in fish. *Environ. Biol. Fish.* **35**:109-131.

- BRADFORD, C.S., FITZPATRICK, M.S., SCHRECK, C.B. (1992) Evidence for ultra-short-loop feedback in ACTH-induced interrenal steroidogenesis in coho salmon: acute self-suppression of cortisol secretion *in vitro*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **87**:292-299.
- BUBENIK, G.A., PANG, S.F. (1997) Melatonin levels in the gastrointestinal tissues of fish, amphibians, and a reptile. *Gen. Comp. Endocrinol.* **106**:405-419.
- BUIJS, R.M., KALSBECK, A. (2001) Hypothalamic integration of central and peripheral clocks. *Nat. Rev. Neurosci.* **2**: 521-526.
- BUIJS, R.M., WORTEL, J., VAN HEERIKHUIZE, J.J., KALSBECK, A. (1997) Novel environment induced inhibition of corticosterone secretion: physiological evidence for a suprachiasmatic nucleus mediated neuronal hypothalamo-adrenal cortex pathway. *Brain Res.* **758**:229-236.
- BUIJS, R.M., WORTEL, J., VAN HEERIKHUIZE, J.J., FEENSTRA, M.G., TER HORST, G.J., ROMIJN, H.J., KALSBECK, A. (1999) Anatomical and functional demonstration of a multisynaptic suprachiasmatic nucleus adrenal (cortex) pathway. *Eur. J. Neurosci.* **11**:1535-1544.
- BURGESS, H.J., REVELL, V.L., MOLINA, T.A., EASTMAN, C.I. (2010) Human phase response curves to three days of daily melatonin: 0.5 mg *versus* 3.0 mg. *J. Clin. Endocr. Metab.* **95**:3325-3331.
- BURY N.R., STURM A. (2007) Evolution of the corticosteroid receptor signalling pathway in fish. *Gen. Comp. Endocrinol.* **153**:47-56.
- BUSTIN, S.A. (2000) Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J. Mol. Endocrinol.* **25**:169-193.
- CAHILL, G.M. (1996) Circadian regulation of melatonin production in cultured zebrafish pineal and retina. *Brain Res.* **708**:177-181.
- CAHILL, G.M. (2002) Clock mechanisms in zebrafish. *Cell Tissue Res.* **309**:27-34.
- CAHILL, G.M., BESHARSE, J.C. (1991) Resetting the circadian clock in cultured *Xenopus* eyecups: regulation of retinal melatonin rhythms by light and D2 dopamine receptors. *J. Neurosci.* **10**:2959-2971.
- CALDELAS, I., POIREL, V.J., SICARD, B., PEVET, P., CHALLET, E. (2003) Circadian profile and photic regulation of clock genes in the suprachiasmatic nucleus of a diurnal mammal *Arvicantis ansorgei*. *Neuroscience* **116**:583-591.
- CAMBRAS RIU, T. (2006) Propiedades fundamentales de los ritmos circadianos. En: *Cronobiología básica y clínica*. Madrid, J.A., Rol de Lama, M.A. (Eds.). Editec@Red, Madrid. pp. 151-189.
- CAMPINO, C., VALENZUELA, F., ARTEAGA, E., TORRES-FARFÁN, C., TRUCCO, C., VELASCO, A., GUZMÁN, S., SERÓN-FERRÉ, M. (2008) La melatonina reduce la respuesta de cortisol al ACTH en humanos. *Rev. Méd. Chile* **136**:1390-1397.
- CAMPINO, C., VALENZUELA, F.J., TORRES-FARFAN, C., REYNOLDS, H.E., ABARZUA-CATALAN, L., ARTEAGA, E., TRUCCO, C., GUZMÁN, S., VALENZUELA, G.J., SERON-FERRE, M. (2011) Melatonin exerts direct inhibitory actions on ACTH responses in the human adrenal gland. *Horm. Metab. Res.* **43**:337-342.

- CARPENTER, R.E., WATT, M.J., FORSTER, G.L., ØVERLI, Ø., BOCKHOLT, C., RENNER, K.J., SUMMERS, C.H. (2007) Corticotropin releasing factor induces anxiogenic locomotion in trout and alters serotonergic and dopaminergic activity. *Horm. Behav.* **5**:600-611.
- CARR, J.A. (2002) Stress, neuropeptides, and feeding behavior: a comparative perspective. *Integr. Comp. Biol.* **42**:582-590.
- CARUSO, G., GENOVESE, L., MARICCHIOLO, G., MODICA, A. (2005) Haematological, biochemical and immunological parameters as stress indicators in *Dicentrarchus labrax* and *Sparus aurata* farmed in off-shored cages. *Aquacult. Int.* **13**:67-73.
- CASSONE, V.M. (1990) Effects of melatonin on vertebrate circadian systems. *Trends Neurosci.* **13**:457-464.
- CASSONE, V.M., NATESAN, A.K. (1997) Time and time again: the phylogeny of melatonin as a transducer of biological time. *J. Biol. Rhythms* **12**:489-497.
- CASSONE, V.M., LANE, R.F., MENAKER, M. (1986) Melatonin-induced increases in serotonin concentrations in specific regions of the chicken brain. *Neuroendocrinology* **42**:38-43.
- CASTAÑEDA, T.R., MÁRQUEZ DE PRADO, B., PRIETO, D., MORA, F. (2004) Circadian rhythms of dopamine, glutamate and GABA in the striatum and nucleus accumbens of the awake rat: modulation by light. *J. Pineal Res.* **36**:177-185.
- CASTILLO, J., CASTELLANA, B., ACERETE, L., PLANAS, J.V., GOETZ, F.W., MACKENZIE, S., TORT, L. (2008) Stress-induced regulation of steroidogenic acute regulatory protein expression in head kidney of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *J. Endocrinol.* **196**:313-322.
- CASTRO, M.G., MORRISON, E. (1997) Post-translational processing of proopiomelanocortin in the pituitary and in the brain. *Crit. Rev. Neurobiol.* **11**:35-57.
- CAVALLARI, N., FRIGATO, E., VALLONE, D., FRÖHLICH, N., LÓPEZ-OLMEDA, J.F., FOÀ, A., BERTI, R., SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, F.J., BERTOLUCCI, C., FOULKES, N.S. (2011) A blind circadian clock in cavefish reveals that opsins mediate peripheral clock photoreception. *PLoS Biol.* **9**:e1001142.
- CERDÁ-REVERTER, J.M., PETER, R.E. (2003) Endogenous melanocortin antagonist in fish: structure, brain mapping, and regulation by fasting of the goldfish agouti-related protein gene. *Endocrinology* **144**:4552-4561.
- CERDÁ-REVERTER, J.M., ZANUY, S., CARRILLO, M., MADRID, J.A. (1998) Time-course studies on plasma glucose, insulin, and cortisol in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) held under different photoperiodic regimes. *Physiol. Behav.* **64**:245-250.
- CERDÁ-REVERTER, J.M., SCHIÖTH, H.B., PETER, R.E. (2003) The central melanocortin system regulates food intake in goldfish. *Regul. Peptides* **115**:101-113.
- CERMAKIAN, N., WHITMORE, D., FOULKES, N.S., SASSONE-CORSI, P. (2000) Asynchronous oscillations of two zebrafish CLOCK partners reveal differential clock control and function. *PNAS* **97**:4339-4344.

- CHABOT, C.C., MENAKER, M. (1992) Effects of physiological cycles of infused melatonin on circadian rhythmicity in pigeons. *J. Comp. Physiol. A* **170**:615-622.
- CHALLET, E. (2007) Entrainment of the suprachiasmatic clockwork in diurnal and nocturnal mammals. *Endocrinology* **148**:5648-5655.
- CHALLET, E., PÉVET, P. (2003) Interactions between photic and nonphotic stimuli to synchronize the master circadian clock in mammals. *Front. Biosci.* **8**:246-257.
- CHANDROO, K.P., DUNCAN, I.J.H., MOCCIA, R.D. (2004) Can fish suffer?: perspectives on sentience, pain, fear and stress. *Appl. Anim. Behav. Sci.* **86**:225-250.
- CHAUBE, R., JOY, K.P. (2002) Effects of altered photoperiod and temperature, serotonin-affecting drugs, and melatonin on brain tyrosine hydroxylase activity in female catfish, *Heteropneustes fossilis*: a study correlating ovarian activity changes. *J. Exp. Zool.* **293**:585-593.
- CHOMCZYNSKI, P., SACCHI, N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**:156-159.
- CHROUSOS, G.P. (1998) Ultradian, circadian, and stress-related hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity-a dynamic digital-to-analog modulation. *Endocrinology* **139**:437-440.
- CHU, D.L.H., LI, V.W.T., YU, R.M.K. (2010) Leptin: clue to poor appetite in oxygen-starved fish. *Mol. Cell. Endocrinol.* **319**:143-146.
- CHUANG, J.I., LIN, M.T. (1994) Pharmacological effects of melatonin treatment on both locomotor activity and brain serotonin release in rats. *J. Pineal Res.* **17**:11-16.
- CLARK, B.J., WELLS, J., KING, S.R., STOCCO, D.M. (1994) The purification, cloning and expression of a novel luteinizing hormone-induced mitochondrial protein in MA-10 mouse Leydig tumor cells. Characterization of the steroidogenic acute regulatory protein StAR. *J. Biol. Chem.* **269**:28314-28322.
- CLARK, B.J., SOO, S.C., CARON, K.M., IKEDA, Y., PARKER, K.L., STOCCO, D.M. (1995) Hormonal and developmental regulation of the steroidogenic acute regulatory protein. *Mol. Endocrinol.* **9**:1346-1355.
- CLEMENTS, S., SCHRECK, C.B. (2004) Evidence that GABA mediates dopaminergic and serotonergic pathways associated with locomotor activity in juvenile chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Behav. Neurosci.* **118**:191-198.
- CLEMENTS, S., SCHRECK, C.B. (2007) Chronic administration of fluoxetine alters locomotor behavior, but does not potentiate the locomotor stimulating effects of CRH in juvenile Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Comp. Biochem. Phys. A* **147**:43-49.
- CLEMENTS, S., SCHRECK, C.B., LARSEN, D.A., DICKHOFF, W.W. (2002) Central administration of corticotropin-releasing hormone stimulates locomotor activity in juvenile chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Gen. Comp. Endocrinol.* **125**:319-327.

- CLEMENTS, S., MOORE, F.L., SCHRECK, C.B. (2003) Evidence that acute serotonergic activation potentiates the locomotor-stimulating effects of corticotropin-releasing hormone in juvenile chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Horm. Behav.* **43**:214-221.
- CNAANI, A., MCLEAN, E. (2009) Time-course response of cobia (*Rachycentron canadum*) to acute stress. *Aquaculture* **289**:140-142.
- COLL, A.P., FASSNACHT, M., KLAMMER, S., HAHNER, S., SCHULTE, D.M., PIPER, S., TUNG, Y.C.L., CHALLIS, B.G., WEINSTEIN, Y., ALLOLIO, B., O'RAHILLY, S., BEUSCHLEIN, F. (2006) Peripheral administration of the N-terminal pro-opiomelanocortin fragment 1-28 to *Pomc*^{-/-} mice reduces food intake and weight but does not affect adrenal growth or corticosterone production. *J. Endocrinol.* **190**:515-525.
- CONDE-SIEIRA, M. (2012) Efectos del estrés sobre la ingesta de alimento y su regulación por mecanismos neuroendocrinos y metabólicos en peces teleósteos. Tesis Doctoral. Universidad de Vigo.
- CONDE-SIEIRA, M., AGUILAR, A.J., LÓPEZ-PATIÑO, M.A., MÍGUEZ, J.M., SOENGAS, J.L. (2010a) Stress alters food intake and glucosensing response in hypothalamus, hindbrain, liver, and Brockmann bodies of rainbow trout. *Physiol. Behav.* **101**:483-493.
- CONDE-SIEIRA, M., LIBRÁN-PÉREZ, M., LÓPEZ-PATIÑO, M.A., MÍGUEZ, J.M., SOENGAS, J.L. (2010b) CRF treatment induces a readjustment in glucosensing capacity in the hypothalamus and hindbrain of rainbow trout. *J. Exp. Biol.* **214**:3887-3894.
- CONDE-SIEIRA, M., AGULLEIRO, M.J., AGUILAR, A.J., MÍGUEZ, J.M., CERDÁ-REVERTER, J.M., SOENGAS, J.L. (2010c) Effect of different glycaemic conditions on gene expression of neuropeptides involved in control of food intake in rainbow trout; interaction with stress. *J. Exp. Biol.* **213**:3858-3865.
- CONDE-SIEIRA, M., LIBRÁN-PÉREZ, M., LÓPEZ-PATIÑO, M.A., SOENGAS, J.L., MÍGUEZ, J.M. (2012a) Melatonin treatment alters glucosensing capacity and mRNA expression levels of peptides related to food intake control in rainbow trout hypothalamus. *Gen. Comp. Endocrinol.* **178**:131-138.
- CONDE-SIEIRA, M., LÓPEZ-PATIÑO, M.A., MÍGUEZ, J.M., SOENGAS, J.L. (2012b) Glucosensing capacity in rainbow trout liver displays day-night variations possibly related to melatonin action. *J. Exp. Biol.* **215**:3112-3119.
- CONDE-SIEIRA, M., ÁLVAREZ, R., LÓPEZ-PATIÑO, M.A., MÍGUEZ, J.M., FLIK, G., SOENGAS, J.L. (2013) ACTH-stimulated cortisol release from head kidney of rainbow trout is modulated by glucose concentration. *J. Exp. Biol.* **216**:554-567.
- COOK, K.V., O'CONNOR, C.M., MCCONNACHIE, S.H., GILMOUR, K.M., COOKE, S.J. (2012) Condition dependent intra-individual repeatability of stress-induced cortisol in a freshwater fish. *Comp. Biochem. Physiol. A* **161**:337-343.
- COPELAND, D.L., DUFF, R.J., LIU, Q., PROKOP, J., LONDRAVILLE, R.L. (2011) Leptin in teleost fishes: an argument for comparative study. *Front. Physiol.* **2**:1-11.

- COSTA, J.L., BUI, S., REED, P., DORES, R.M., BRENNAN, M.B., HOCHGESCHWENDER, U. (2004) Mutational analysis of evolutionarily conserved ACTH residues. *Gen. Comp. Endocrinol.* **136**:12-16.
- CRAIG, P.M., AL-TIMIMI, H., BERNIER, N.J. (2005) Differential increase in forebrain and caudal neurosecretory system corticotropin-releasing factor and urotensin I gene expression associated with seawater transfer in rainbow trout. *Endocrinology* **146**:3851-3860.
- DALLMAN, M.F., ENGELAND, W.C., ROSE, J.C., WILKINSON, C.W., SHINSAKO, J., SIEDENBURG, F. (1978) Nycthemeral rhythm in adrenal responsiveness to ACTH. *Am. J. Physiol. R* **235**: 210-218.
- DARDENTE, H., MENET, J.S., POIREL, V.-J., STREICHER, D., GAUER, F., VIVIEN-ROELS, B., KLOSEN, P., PÉVET, P., MASSON-PÉVET, M. (2003) Melatonin induces *Cry1* expression in the pars tuberalis of the rat. *Mol. Brain Res.* **114**:101-106.
- DAS, M. (1995) The energetics of stress tolerance in the early life stages of the goldfish *Carassius auratus* L. University of Stirling.
- DAVIE, A., MINGHETTI, M., MIGAUD, H. (2009) Seasonal variations in clock-gene expression in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Chronobiol Int.* **26**:379-395.
- DAVIS, R. E., KASSEL, J. (1983) Behavioural functions of the teleostean telencephalon. En: *Fish neurobiology*. Vol. 2. Davis, R. E.; Northcutt, R. G. (Eds.). University of Michigan Press. pp. 285-315.
- DAVIS, K.B., SMALL, B.C. (2006) Rates of cortisol increase and decrease in channel catfish and sunshine bass exposed to an acute confinement stressor. *Comp. Biochem. Phys. B* **143**:134-139.
- DE GROEF, B., VAN DER GEYTEN, S., DARRAS, V.M., KÜHN, E.R. (2006) Role of corticotropin-releasing hormone as a thyrotropin-releasing factor in nonmammalian vertebrates. *Gen. Comp. Endocrinol.* **146**:62-68.
- DE PEDRO, N., BJÖRNSSON, T. (2001) Regulation of food intake by neuropeptides and hormones. En: *Food intake in fish*. Houlihan, D., Boujard, T., Jobling, M. (Eds.). Blackwell Science Ltd., Oxford. pp. 267-296.
- DE PEDRO, N., ALONSO-GÓMEZ, A.L., GANCEDO, B., DELGADO, M.J., ALONSO-BEDATE, M. (1993) Role of corticotropin-releasing factor (CRF) as a food intake regulator in goldfish. *Physiol. Behav.* **53**:517-520.
- DE PEDRO, N., GANCEDO, B., ALONSO-GÓMEZ, A.L., DELGADO, M.J., ALONSO-BEDATE, M. (1995) CRF effects on thyroid function is not mediated by feeding behavior in goldfish. *Pharmacol. Biochem. Be.* **51**:885-890.
- DE PEDRO, N., ALONSO-GÓMEZ, A.L., GANCEDO, B., VALENCIANO, A.I., DELGADO, M.J., ALONSO-BEDATE, M. (1997). Effect of α -helical-CRF_[9-41] on feeding in goldfish: involvement of cortisol and catecholamines. *Behav. Neurosci.* **111**:398-403.
- DE PEDRO, N., DELGADO, M.J., PINILLOS, M.L., ALONSO-GÓMEZ, A.L., ALONSO-BEDATE, M. (1998a) Daily rhythms in NAT activity, cortisol, glucose, glycogen and catecholamines in tench (*Tinca tinca* L.). *Polskie Arch. Hydrobiol.* **45**:321-329.

- DE PEDRO, N., PINILLOS, M.L., VALENCIANO, A.I., ALONSO-BEDATE, M., DELGADO, M.J. (1998b) Inhibitory effect of serotonin in feeding behavior in goldfish: involvement of CRF. *Peptides* **19**:505-511.
- DE PEDRO N., DELGADO M.J., ALONSO-BEDATE M. (2001) Fasting and hypothalamic catecholamines in goldfish. *J. Fish Biol.* **58**:1404-1413.
- DE PEDRO, N., GUIJARRO, A.I., LÓPEZ-PATIÑO, M.A., MARTÍNEZ-ÁLVAREZ, R.M., DELGADO, M.J. (2005) Daily and seasonal variations in haematological and blood biochemical parameters in the tench, *Tinca tinca* Linnaeus, 1758. *Aquac. Res.* **36**:1185-1196.
- DE PEDRO, N., MARTÍNEZ-ÁLVAREZ, R.M., DELGADO, M.J. (2008) Melatonin reduces body weight in goldfish (*Carassius auratus*): effects on metabolic resources and some feeding regulators. *J. Pineal Res.* **45**:32-39.
- DEL POZO, A, MONTOYA, A., VERA, L.M., SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, F.J. (2012) Daily rhythms of clock gene expression, glycaemia and digestive physiology in diurnal/nocturnal European seabass. *Physiol. Behav.* **106**:446-450.
- DELAHUNTY, G., TOMLINSON, M. (1984) Hypoglycemic effects of melatonin in the goldfish, *Carassius auratus*. *Comp. Biochem. Physiol. A* **78**:871-875.
- DELAHUNTY, G., BAUER, G., PRACK, M., DE VLAMING, V. (1978) Effects of pinealectomy and melatonin treatment on liver and plasma metabolites in the goldfish, *Carassius auratus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **35**:99-109.
- DELAUNAY, F., THISSE, C., MARCHAND, O., LAUDET, V., THISSE, B. (2000) An inherited functional circadian clock in zebrafish embryos. *Science* **289**:297-300.
- DICKMEIS, T. (2009) Glucocorticoids and the circadian clock. *J. Endocrinol.* **200**:3-22.
- DICKMEIS, T., FOULKES, N.S. (2011) Glucocorticoids and circadian clock control of cell proliferation: at the interface between three dynamic systems. *Mol. Cell. Endocrinol.* **331**:11-22.
- DICKSTEIN, G., SHECHNER, C., NICHOLSON, W.E., ROSNER, I., SHEN-ORR, Z., ADAWI, F., LAHAV, M. (1991) Adrenocorticotropin stimulation test: effects of basal cortisol level, time of day, and suggested new sensitive low dose test. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **72**:773-778.
- DÍEZ-NOGUERA, A. (2006) Representación gráfica y análisis de datos en cronobiología. En: *Cronobiología básica y clínica*. Madrid, J.A., Rol de Lama, M.A. (Eds.). Editec@Red, Madrid. pp. 83-121.
- DOHLMAN, H.G., THORNER, J., CARON, M.G., LEFKOWITZ, R.J. (1991) Model systems for the study of seven-transmembrane-segment receptors. *Annu. Rev. Biochem.* **60**:653-688.
- DOYLE, S.L., GRACE, M.S., McIVOR, W., MENAKER, M. (2002) Circadian rhythms of dopamine in mouse retina: The role of melatonin. *Visual Neurosci.* **19**:593-601.
- DOYON, C., GILMOUR, K.M., TRUDEAU, V.L., MOON, T.W. (2003) Corticotropin-releasing factor and neuropeptide Y mRNA levels are elevated in the preoptic area of socially subordinate rainbow trout. *Gen. Comp. Endocrinol.* **133**:260-271.

- DOYON, C., TRUDEAU, V.L., MOON, T.W. (2005) Stress elevates corticotropin-releasing factor (CRF) and CRF-binding protein mRNA levels in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Endocrinol.* **186**:123-130.
- DROUIN, J., SUN, Y.L., NEMER, M. (1989) Glucocorticoid repression of pro-opiomelanocortin gene transcription. *J. Steroid Biochem.* **34**:63-69.
- DUBOCOVICH, M.L. (1983) Melatonin is a potent modulator of dopamine release in the retina. *Nature* **306**:782-786.
- DUBOCOVICH, M.L., CARDINALI, D.P., DELAGRANGE, P., KRAUSE, D.N., STROBERG, A.D., SUDGEN, D., YOCCA, F.D. (2002) The IUPHAR compendium of receptor characterization and classification. IUPHAR Media, Londres. pp. 187-193.
- DUGGLEBY, R.G. (1981) A nonlinear regression program for small computers. *Anal. Biochem.* **110**:9-18.
- DUNLAP, J.C. (1999) Molecular bases for circadian clocks. *Cell* **96**:271-290.
- EBBESSON, S.O.E., SMITH, J., CONCHITA, C., EBBESSON, L.O.E. (1996) Transient alterations in neurotransmitter levels during a critical period of neural development in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Brain Res.* **742**:339-342.
- EBBESSON, L.O., BJÖRNSSON, B.T., EKSTRÖM, P., STEFANSSON, S.O. (2008) Daily endocrine profiles in parr and smolt Atlantic salmon. *Comp. Biochem. Phys. A* **151**:698-704.
- EHRENSTRÖM, F., JOHANSSON, P. (1987) Circadian rhythms and contents of catechols in different brain structures, peripheral organs and plasma of the Atlantic cod, *Gadus morhua*. *Comp. Biochem. Phys. C* **87**:193-202.
- EJIKE, C., SCHRECK, C.B. (1980) Stress and social hierarchy rank in coho salmon. *Trans. Am. Fish. Soc.* **109**:423-426.
- EKSTRÖM, P., MEISSEL, H. (1997) The pineal organ of fishes. *Rev. Fish Biol. Fisher.* **7**:199-284.
- EL HALAWANI, M.E., KANG, S.W., LECLERC, B., KOSONSIRILUK, S., CHAISEHA, Y. (2009) Dopamine-melatonin neurons in the avian hypothalamus and their role as photoperiodic clocks. *Gen. Comp. Endocrinol.* **163**:123-127.
- ELLIS, T., YILDIZ, H.Y., LÓPEZ-OLMEDA, J., SPEDICATO, M.T., TORT, L., ØVERLI, Ø, MARTINS, C.I.M. (2012) Cortisol and finfish welfare. *Fish Physiol. Biochem.* **38**:163-188.
- ENGELAND, W.C., ARNHOLD, M.M. (2005) Neural circuitry in the regulation of the adrenal corticosterone rhythmicity. *Endocrine* **28**:325-332.
- ESCAMES, G., ACUÑA-CASTROVIEJO, D., VIVES, F. (1996) Melatonin-dopamine interaction in the striatal projection area of sensorimotor cortex in the rat. *Neuroreport* **7**:597-600.
- ESTEBAN, S., GARAU, C., APARICIO, S., MORANTA, D., BARCELÓ, P., FIOL, M.A., RIAL, R. (2010) Chronic melatonin treatment and its precursor L-tryptophan improve the monoaminergic neurotransmission and related behavior in the aged rat brain. *J. Pineal Res.* **48**:170-177.

- FAHRENKRUG, J., HANNIBAL, J., GEORG, B. (2008) Diurnal rhythmicity of the canonical clock genes *Per1*, *Per2* and *Bmal1* in the rat adrenal gland is unaltered after hypophysectomy. *J. Neuroendocrinol.* **20**:323-329.
- FALCÓN, J. (1999) Cellular circadian clocks in the pineal. *Prog. Neurobiol.* **58**:121-62.
- FALCÓN, J., BOILLIET, V., COLLIN, J.P. (1996) Partial characterization of serotonin *N*-acetyltransferases from northern pike (*Esox lucius*, L.) pineal organ and retina. *Pflugers Arch.* **432**:386-393.
- FALCÓN, J., BESSEAU, L., FAZZARI, D., ATTIA, J., GAILDRAT, P., BEAUCHAUD, M., BOEUF, G. (2003) Melatonin modulates secretion of growth hormone and prolactin by trout pituitary glands and cells in culture. *Endocrinology* **144**:4648-4658.
- FALCÓN, J., BESSEAU, L., SAUZET, S., BOEUF, G. (2007) Melatonin effects on the hypothalamo-pituitary axis in fish. *Trends Endocrin. Met.* **18**:81-88.
- FALCÓN, J., MIGAUD, H., MUÑOZ-CUETO, J.A., CARRILLO, M. (2010) Current knowledge on the melatonin system in teleost fish. *Gen. Comp. Endocrinol.* **165**:469-482.
- FAO (2004) El estado mundial de la pesca y la acuicultura. Servicio de Gestión de las Publicaciones FAO, Roma.
- FAO (2006) El estado mundial de la pesca y la acuicultura. Servicio de Gestión de las Publicaciones FAO, Roma.
- FELICIANO, A., VIVAS, Y., DE PEDRO, N., DELGADO, M.J., VELARDE, E., ISORNA, E. (2011) Feeding time synchronizes clock gene rhythmic expression in brain and liver of goldfish (*Carassius auratus*). *J. Biol. Rhythms* **26**:24-33.
- FERNÁNDEZ-DURÁN, B., RUIBAL, C., POLAKOF, S., CEINOS, R.M., SOENGAS, J.L., MÍGUEZ, J.M. (2007) Evidence for arylalkylamine *N*-acetyltransferase (*AANAT2*) expression in rainbow trout peripheral tissues with emphasis in the gastrointestinal tract. *Gen. Comp. Endocrinol.* **152**:289-294.
- FLEURY, A., DUCHARME, L., LEHOUX, J.G. (1998) *In vivo* effects of adrenocorticotrophin on the expression of the hamster steroidogenic acute regulatory protein. *J. Mol. Endocrinol.* **21**:131-139.
- FLIK, G., KLAREN, P.H.M., VANH DEN BURG, E.H., METZ, J.R., HUISING, M.O. (2006) CRF and stress in fish. *Gen. Comp. Endocrinol.* **146**:36-44.
- FOÀ, A., MINUTINI, L., INNOCENTI, A. (1992) Melatonin: a coupling device between oscillators in the circadian system of the ruin lizard *Podarcis sicula*. *Comp. Biochem. Physiol. A* **103**:719-723.
- FORTHOFFER, R.N., LEE, E.S., HERNÁNDEZ, M. (2007) Biostatistics. A guide to design, analysis, and discovery. Academic Press, Londres. pp. 63-64.
- FRUNGIERI, M.B., MAYERHOFER, A., ZITTA, K., PIGNATARO, O.P., CALANDRA, R.S., GONZÁLEZ-CALVAR, S.I. (2005) Direct effect of melatonin on Syrian hamster testes: melatonin subtype 1a receptors, inhibition of androgen production, and interaction with the local corticotropin-releasing hormone system. *Endocrinology* **146**:1541-1552.

- FUCHS, E., WASMUTH, J.C., FLÜGGE, G., HUETHER, G., TROOST, R., BEYER, J. (1996) Diurnal variation of corticotropin-releasing factor binding sites in the rat brain and pituitary. *Cell. Mol. Neurobiol.* **16**:21-37.
- GALLEGO, M., VIRSHUP, D.M. (2007) Post-translational modifications regulate the ticking of the circadian clock. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**:139-148.
- GANGA, R., TORT, L., ACERETE, L., MONTERO, D., IZQUIERDO, M.S. (2006) Modulation of ACTH-induced cortisol release by polyunsaturated fatty acids in interrenal cells from gilthead seabream, *Sparus aurata*. *J. Endocrinol.* **190**:39-45.
- GARCÍA, L.E., MEIER, A.H. (1973) Daily rhythms in concentration of plasma cortisol in male and female gulf killifish, *Fundulus grandis*. *Biol. Bull.* **144**:471-479.
- GARCÍA-ALLEGUE, R., LAX, P., MADARIAGA, M., MADRID, J.A. (2001) Locomotor and feeding activity rhythms in a light-entrained diurnal rodent, *Octodon degus*. *Am. J. Physiol.* **277**:523-531.
- GARRICK, N.A., HILL, J.L., SZELE, F.G., TOMAI, T.P., GOLD, P.W., MURPHY, D.L. (1987) Corticotropin-releasing factor: a marked circadian rhythm in primate cerebrospinal fluid peaks in the evening and is inversely related to the cortisol circadian rhythm. *Endocrinology* **121**:1329-1334.
- GESLIN, M., AUPERIN, B. (2004) Relationship between changes in mRNAs of the genes encoding steroidogenic acute regulatory protein and P450 cholesterol side chain cleavage in head kidney and plasma levels of cortisol in response to different kinds of acute stress in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Gen. Comp. Endocrinol.* **135**:70-80.
- GFELL, B., KLOAS, W., HANKE, W. (1997) Neuroendocrine effects on adrenal hormone secretion in carp (*Cyprinus carpio*). *Gen. Comp. Endocrinol.* **106**:310-319.
- GHISLENI, G., CAPIOTTI, K.M., DA SILVA, R.S., OSES, J.P., PIATO, A.L., SOARES, V., BOGO, M.R., BONAN, C.D. (2012) The role of CRH in behavioral responses to acute restraint stress in zebrafish. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* **36**:176-182.
- GIBSON, U.E., HEID, C.A., WILLIAMS, P.M. (1996) A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res.* **6**:995-1001.
- GILCHRIEST, B.J., TIPPING, D.R., LEVY, A., BAKER, B.I. (1998) Diurnal changes in the expression of genes encoding for arginine vasotocin and pituitary pro-opiomelanocortin in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): correlation with changes in plasma hormones. *J. Neuroendocrinol.* **10**:937-943.
- GILCHRIEST, B.J., TIPPING, D.R., HAKE, L., LEVY, A., BAKER, B.I. (2000) The effects of acute and chronic stresses on vasotocin gene transcripts in the brain of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Neuroendocrinol.* **12**:795-801.
- GIROTTI, M., WEINBERG, M.S., SPENCER, R.L. (2009) Diurnal expression of functional and clock-related genes throughout the rat HPA axis: system-wide shifts in response to a restricted feeding schedule. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. E* **296**:888-897.

- GOMPERTS, B.D., KRAMER, I.M., TATHAM, P.E.R. (2002) Signal transduction. Academic Press, Oxford.
- GORISSEN, M., BERNIER, N.J., MANUEL, R., DE GELDER, S., METZ, J.R., HUISING, M.O., FLIK, G. (2012) Recombinant human leptin attenuates stress axis activity in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Gen. Comp. Endocrinol.* **178**:75-81.
- GREENBERG, N., CARR, J.A., SUMMERS, C.H. (2002) Causes and consequences of stress. *Integr. Comp. Biol.* **42**:508-516.
- GREGORY, T.R., WOOD, C.M. (1999) The effects of chronic plasma cortisol elevation on the feeding behaviour, growth, competitive ability, and swimming performance of juvenile rainbow trout. *Physiol. Biochem. Zool.* **72**:286-295.
- GRILLNER, S., WALLÉN, P., SAITOH, K., KOZLOV, A., ROBERTSON, B. (2008) Neural bases of goal-directed locomotion in vertebrates-An overview. *Brain Res. Rev.* **57**:2-12.
- GUIJARRO, A.I. (2004) Ritmicidad diaria y estacional en el teleósteo *Tinca tinca*: implicaciones funcionales. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid.
- GWINNER, E., BENZINGER, I. (1978) Synchronization of a circadian rhythm in pinealectomized European starlings by daily injections of melatonin. *J. Comp. Physiol. A* **127**:209-213.
- HADLEY, M.E. (1997) Hormonas esteroides adrenales. En: *Endocrinología*. Prentice Hall, Madrid. pp. 395-432.
- HAGEN, I.J., KUSAKABE, M., YOUNG, G. (2006) Effects of ACTH and cAMP on steroidogenic acute regulatory protein and P450 11 β -hydroxylase messenger RNAs in rainbow trout interrenal cells: relationship with *in vitro* cortisol production. *Gen. Comp. Endocrinol.* **145**:254-262.
- HAITINA, T., KLOVINS, J., TAKAHASHI, A., LÖWGREN, M., RINGHOLM, A., ENBERG, J., KAWAUCHI, H., LARSON, E.T., FREDRIKSSON, R., SCHIÖTH, H.B. (2007) Functional characterization of two melanocortin (MC) receptors in lamprey showing orthology to the MC1 and MC4 receptor subtypes. *BMC Evol. Biol.* **7**:101-114.
- HALDAR, C.M., THAPLIYAL, J.P. (1979) Pineal-adrenal relationship in a lizard *Calotes versicolor*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **39**:414-416.
- HALLER, J., MIKICS, É., MAKARA, G.B. (2008) The effects of non-genomic glucocorticoid mechanisms on body functions and the central neural system. A critical evaluation of findings. *Front. Neuroendocrin.* **29**:273-291.
- HAMDI, A. (1998) Melatonin administration increases the affinity of D2 dopamine receptors in the rat striatum. *Life Sci.* **63**:2115-2120.
- HARDELAND, R. (2008) Melatonin, hormone of darkness and more-occurrence, control mechanisms, actions and bioactive metabolites. *Cell. Mol. Life Sci.* **65**:2001-2018.
- HASTINGS, M.H., MAYWOOD, E.S., O'NEILL, J.S. (2008a) Cellular circadian pacemaking and the role of cytosolic rhythms. *Curr. Biol. R* **18**:805-815.
- HASTINGS, M.H., MAYWOOD, E.S., REDDY, A.B. (2008b) Two decades of circadian time. *J. Neuroendocrinol.* **20**:812-819.

- HAU, M., GWINNER, E. (1994) Melatonin facilitates synchronization of sparrow circadian rhythms to light. *J. Comp. Physiol. A* **175**:343-347.
- HAU, M., GWINNER, E. (1995) Continuous melatonin administration accelerates resynchronization following phase shifts of a light-dark cycle. *Physiol. Behav.* **58**:89-95.
- HAURY, J., OMBREDANE, D., BAGLINIÈRE, J.-L. (1991) L'habitat de la truite commune (*Salmo trutta*), en cours d'eau. En: *La truite: biologie et écologie*. Baglinière, J.-L., Maisse, G. (Eds.). INRA, París. pp. 47-96.
- HAUS, E. (2007). Chronobiology in the endocrine system. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **59**:985-1014.
- HEIGL, S., GWINNER, E. (1995) Synchronization of circadian rhythms of house sparrows by oral melatonin: effects of changing period. *J. Biol. Rhythms* **10**:225-233.
- HEIGL, S., GWINNER, E. (1999) Periodic food availability synchronizes locomotor and feeding activity in pinealectomized house sparrows. *Zoology* **102**:1-9.
- HEIMAN, M.L., PORTER, J.R. (1980) Inhibitory effects of a pineal extract on adrenal cortex. Lack of competition with ACTH. *Horm. Res.* **12**:104-112.
- HERMAN, J.P., FIGUEIREDO, H., MUELLER, N.K., ULRICH-LAI, Y., OSTRANDER, M.M., CHOI, D.C., CULLINAN, W.E. (2003) Central mechanisms of stress integration: hierarchical circuitry controlling hypothalamo-pituitary-adrenocortical responsiveness. *Front. Neuroendocrin.* **24**:151-180.
- HERNÁNDEZ-RAUDA, R., ALDEGUNDE, M. (2002) Effects of acute 17alpha-methyltestosterone, acute 17beta-estradiol, and chronic 17alpha-methyltestosterone on dopamine, norepinephrine and serotonin levels in the pituitary, hypothalamus and telencephalon of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Comp. Physiol. B* **172**:659-667.
- HERNÁNDEZ-RAUDA, R., MIGUEZ, J.M., RUIBAL, C., ALDEGUNDE, M. (2000) Effects of melatonin on dopamine metabolism in the hypothalamus and the pituitary of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *J. Exp. Zool.* **287**:440-444.
- HERRERA-PÉREZ, P. (2009) Estudio morfofuncional y molecular del órgano pineal y de los receptores de melatonina en la lubina, *Dicentrarchus labrax*. Tesis Doctoral. Universidad de Cádiz.
- HERRERO, M.J., MARTÍNEZ, F.J., MÍGUEZ, J.M., MADRID, J.A. (2007) Response of plasma and gastrointestinal melatonin, plasma cortisol and activity rhythms of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) to dietary supplementation with tryptophan and melatonin. *J. Comp. Physiol. B* **177**:319-326.
- HIRAO, A., NAGAHAMA, H., TSUBOI, T., HIRAO, M., TAHARA, Y., SHIBATA, S. (2010) Combination of starvation interval and food volume determines the phase of liver circadian rhythm in Per2:Luc knock-in mice under two meals per day feeding. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **299**:1045-1053.

- HÖGLUND, E., SØRENSEN, C., JØRGENSEN BAKKE, M., NILSSON, G.E., ØVERLI, Ø. (2007) Attenuation of stress-induced anorexia in brown trout (*Salmo trutta*) by pre-treatment with dietary L-tryptophan. *Brit. J. Nutr.* **97**:786-789.
- HONTELA, A. (1998) Interrenal dysfunction in fish from contaminated sites: *in vivo* and *in vitro* assessment. *Environ. Toxicol. Chem.* **17**:44-48.
- HONTELA, A., LEBLOND, V.S., CHANG, J.P. (2008) Purification and isolation of corticosteroidogenic cells from head kidney of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) for testing cell-specific effects of a pesticide. *Comp. Biochem. Phys. C* **147**:52-60.
- HORI, T.S., GAMPERL, A.K., HASTINGS, C.E., VANDER VOORT, G.E., ROBINSON, J.A.B., JOHNSON, S.C., AFONSO, L.O.B. (2012) Inter-individual and -family differences in the cortisol responsiveness of Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Aquaculture* **324-325**:165-173.
- HOSKINS, L.J., VOLKOFF, H. (2012) Daily patterns of mRNA expression of two core circadian regulatory proteins, Clock2 and Per1, and two appetite-regulating peptides, OX and NPY, in goldfish (*Carassius auratus*). *Comp. Biochem. Phys. A* **163**:127-136.
- HOSKONEN, P., PIRHONEN, J. (2006) Effects of repeated handling, with or without anaesthesia, on feed intake and growth in juvenile rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquac. Res.* **37**:409-415.
- HUANG, T.S., RUOFF, P., FJELLDAL, P.G. (2010) Diurnal expression of clock genes in pineal gland and brain and plasma levels of melatonin and cortisol in Atlantic salmon parr and smolts. *Chronobiol. Int.* **27**:1697-1714.
- HUGHES, R.J., BADIA, P. (1997) Sleep-promoting and hypothermic effects of daytime melatonin administration in humans. *Sleep* **20**:124-131.
- HUISING, M.O., METZ, J.R., VAN SCHOOTEN, C., TAVERNE-THIELE, A.J., HERMSEN, T., VERBURG-VAN KEMENADE, B.M.L., FLIK, G. (2004) Structural characterisation of a cyprinid (*Cyprinus carpio* L.) CRH, CRH-BP and CRH-R1, and the role of these proteins in the acute stress response. *J. Mol. Endocrinol.* **32**:627-648.
- HUISING, M.O., VAN DER AA, L.M., METZ, J.R., MAZON, A. DE F., VERBURG VAN KEMENADE, B.M.L., FLIK, G. (2007) Corticotropin-releasing factor (CRF) and CRF-binding protein expression in and release from the head kidney of common carp: evolutionary conservation of the adrenal CRF system. *J. Endocrinol.* **193**:349-357.
- HUNT, A.E., AL-GHOUL, W.M., GILLETTE, M.U., DUBOCOVICH, M.L. (2001) Activation of MT(2) melatonin receptors in rat suprachiasmatic nucleus phase advances the circadian clock. *Am. J. Physiol.-Cell Ph.* **280**:110-118.
- HUR, S.-P., TAKEUCHI, Y., ITOH, H., UCHIMURA, M., TAKAHASHI, K., KANG, H.-C., LEE, Y.-D., KIM, S.-J., TAKEMURA, A. (2012) Fish sleeping under sandy bottom: Interplay of melatonin and clock genes. *Gen. Comp. Endocrinol.* **177**:37-45.
- HYDE, L.L., UNDERWOOD, H. (1995) Daily melatonin infusions entrain the locomotor activity of pinealectomized lizards. *Physiol. Behav.* **58**:943-951.
- HYDE, L.L., UNDERWOOD, H. (2000) Effects of melatonin administration on the circadian activity rhythm of the lizard *Anolis carolinensis*. *Physiol. Behav.* **71**:183-192.

- IDDA, M.L., BERTOLUCCI, C., VALLONE, D., GOTHILF, Y., SANCHEZ-VAZQUEZ, F.J., FOULKES, N.S. (2012) Circadian clocks: lessons from fish. *Prog. Brain Res.* **199**:41-57.
- IIGO, M., AIDA, K. (1995) Effects of season, temperature, and photoperiod on plasma melatonin rhythm in the goldfish *Carassius auratus*. *J. Pineal Res.* **18**:62-68.
- IIGO, M., TABATA, M. (1996) Circadian rhythms of locomotor activity in the goldfish *Carassius auratus*. *Physiol. Behav.* **60**:775-781.
- IIGO, M., KEZUKA, H., SUZUKI, T., TABATA, M., AIDA, K. (1994) Melatonin signal transduction in the goldfish, *Carassius auratus*. *Neurosci. Biobehav. R.* **18**:563-569.
- IIGO, M., FURUKAWA, K., HATTORI, A., HARA, M., OHTANI-KANEKO, R., SUZUKI, T., TABATA, M., AIDA, K. (1995) Effects of pinealectomy and constant light exposure on day-night changes of melatonin binding sites in the goldfish brain. *Neurosci. Lett.* **197**:61-64.
- IIGO, M., SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, F.J., HARA, M., OHTANI-KANEKO, R., HIRATA, K., SHINOHARA, H., TABATA, M., AIDA, K. (1997) Characterization, guanosine 5'-O-(3-thiotriphosphate) modulation, daily variation, and localization of melatonin-binding sites in the catfish (*Silurus asotus*) brain. *Gen. Comp. Endocrinol.* **108**:45-55.
- IIGO, M., FURUKAWA, K., TABATA, M., AIDA, K. (2003) Circadian variations of melatonin binding sites in the goldfish brain. *Neurosci. Lett.* **347**:49-52.
- IKEGAMI, T., AZUMA, K., NAKAMURA, M., SUZUKI, N., HATTORI, A., ANDO, H. (2009a) Diurnal expressions of four subtypes of melatonin receptor genes in the optic tectum and retina of goldfish. *Comp. Biochem. Phys. A* **152**:219-224.
- IKEGAMI, T., MOTOHASHI, E., DOI, H., HATTORI, A., ANDO, H. (2009b) Synchronized diurnal and circadian expression of four subtypes of melatonin receptor genes in the diencephalon of a puffer fish with lunar-related spawning cycles. *Neurosci. Lett.* **469**:58-63.
- IMBESI, M., ARSLAN, A.D., YILDIZ, S., SHARMA, R., GAVIN, D., TUN, N., MANEV, H., UZ, T. (2009) The melatonin receptor MT1 is required for the differential regulatory actions of melatonin on neuronal "clock" gene expression in striatal neurons *in vitro*. *J. Pineal Res.* **46**:87-94.
- ISHIDA, A., MUTHOH, T., UEJYAMA, T., BANDO, H., MASUBUCHI, S., ANKARA, D., TSUJIMOTO, G., OKAMURA, H. (2005) Light activates the adrenal gland: timing of gene expression and glucocorticoids release. *Cell Metab.* **2**:297-307.
- ISOBE, Y., TORRI, T., KONISHI, E., FUJIOI, J. (2002) Effects of melatonin on running-wheel activity and body temperature differ by the time of day. *Pharmacol. Biochem. Be.* **73**:805-811.
- IUVONE, P.M., BESHARSE, J.C. (1983) Regulation of indoleamine N-acetyltransferase activity in the retina: effects of light and dark, protein synthesis inhibitors and cyclic nucleotide analogs. *Brain Res.* **273**:111-119.
- IUVONE, P.M., TOSINI, G., POZDEYEV, N., HAQUE, R., KLEIN, D.C., CHAURASIA, S.S. (2005) Circadian clocks, clock networks, arylalkylamine N-acetyltransferase, and melatonin in the retina. *Prog. Retinal Eye Res.* **24**:433-456.

- IUVONE, P.M., VELARDE, E., DELGADO, M.J., ALONSO-GÓMEZ, A.L., HAQUE, R. (2010) Circadian clocks in retina of goldfish. En: *Biological clocks in fish*. Kulczykowska, E., Popek, W., Kapoor, B.G. (Eds.). Oxford University Press. pp. 251-260.
- JACOBS, B.L., WILKINSON, L.O., FORNAL, C.A. (1990) The role of brain serotonin. A neurophysiologic perspective. *Neuropsychopharmacol.* **3**:473-479.
- JAILLON, O., AURY, J.M., BRUNET, F., PETIT, J.L., STANGE-THOMANN, N., MAUCELI, E., BOUNEAU, L., FISCHER, C., OZOUF-COSTAZ, C., BERNOT, A., NICAUD, S., JAFFE, D., FISHER, S., LUTFALLA, G., DOSSAT, C., SEGURENS, B., DASILVA, C., SALANOUBAT, M., LEVY, M., BOUDET, N., CASTELLANO, S., ANTHOUARD, V., JUBIN, C., CASTELLI, V., KATINKA, M., VACHERIE, B., BIÉMONT, C., SKALLI, Z., CATTOLICO, L., POULAIN, J., DE BERARDINIS, V., CRUAUD, C., DUPRAT, S., BROTTIER, P., COUTANCEAU, J.P., GOUZY, J., PARRA, G., LARDIER, G., CHAPPLE, C., MCKERNAN, K.J., MCEWAN, P., BOSAK, S., KELLIS, M., VOLFF, J.N., GUIGÓ, R., ZODY, M.C., MESIROV, J., LINDBLAD-TOH, K., BIRREN, B., NUSBAUM, C., KAHN, D., ROBINSON-RECHAVI, M., LAUDET, V., SCHACHTER, V., QUÉTIER, F., SAURIN, W., SCARPELLI, C., WINCKER, P., LANDER, E.S., WEISSENBAACH, J., ROEST CROLLIUS, H. (2004) Genome duplication in the teleost fish *Tetraodon nigroviridis* reveals the early vertebrate proto-karyotype. *Nature* **431**:946-957.
- JANZEN, W.J., DUNCAN, C.A., RILEY, L.G. (2012) Cortisol treatment reduces ghrelin signaling and food intake in tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Domest. Anim. Endocrinol.* **43**:251-259.
- JEFFREY, J.D., ESBAUGH, A.J., VIJAYAN, M.M., GILMOUR, K.M. (2012) Modulation of hypothalamic-pituitary-interrenal axis function by social status in rainbow trout. *Gen. Comp. Endocrinol.* **176**:201-210.
- JENTOFT, S., AASTVEIT, A.H., TORJESEN, P.A., ANDERSEN, O. (2005) Effects of stress on growth, cortisol and glucose levels in non-domesticated Eurasian perch (*Perca fluviatilis*) and domesticated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comp. Biochem. Phys. A* **141**:353-358.
- JILG, A., MOEK, J., WEAVER, D.R., KORF, H.-W., STEHLE, J.H., VON GALL, C. (2005) Rhythms in clock proteins in the mouse pars tuberalis depend on MT1 melatonin receptor signalling. *Eur. J. Neurosci.* **22**:2845-2854.
- JOO, W.S., BYUNG, J., PARK, C.W., MAENG, S.H., KIM, Y.S. (1998) Melatonin increases striatal dopaminergic function in 6-OHDA-lesioned rats. *Neuroreport* **9**:4123-4126.
- KAGEYAMA, K., HANADA, K., MORIYAMA, T., NIGAWARA, T., SAKIHARA, S., SUDA, T. (2006) G protein-coupled receptor kinase 2 involvement in desensitization of corticotropin-releasing factor (CRF) receptor type 1 by CRF in murine corticotrophs. *Endocrinology* **147**:441-450.
- KALSBECK, A., BUIJS, R.M. (2002) Output pathways of the mammalian suprachiasmatic nucleus: coding circadian time by transmitter selection and specific targeting. *Cell Tissue Res.* **309**:109-118.
- KALSBECK, A., PALM, I.F., LA FLEUR, S.E., SCHEER, F.A., PERREAU-LENZ, S., RUITER, M., KREIER, F., CAILOTTO, C., BUIJS, R.M. (2006) SCN outputs and the hypothalamic balance of life. *J. Biol. Rhythms* **21**:458-469.

- KALSBECK, A., VAN DER SPEK, R., LEI, J., ENDERT, E., BUIJS, R.M., FLIERS, E. (2012) Circadian rhythms in the hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis. *Mol. Cell. Endocrinol.* **349**:20-29.
- KANEKO, M., HERNANDEZ-BORSETTI, N., CAHILL, G.M. (2006) Diversity of zebrafish peripheral oscillators revealed by luciferase reporting. *PNAS* **103**:14614-14619.
- KARAKACH, T.K., HUENUPI, E.C., SOO, E.C., WALTER, J.A., AFONSO, L.O.B. (2009) H-1-NMR and mass spectrometric characterization of the metabolic response of juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*) to long-term handling stress. *Metabolomics* **5**:123-137.
- KARAKATSOULI, N., PAPOUTSOGLU, S.E., PANOPOULOS, G., PAPOUTSOGLU, E.S., CHADIO, S., KALOGIANNIS, D. (2008) Effects of light spectrum on growth and stress response of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* reared under recirculating system conditions. *Aquacult. Eng.* **38**:36-42.
- KARSI, A., WALDBIESER, G.C., SMALL, B.C., WOLTERS, W.R. (2005) Genomic structure of the proopiomelanocortin gene and expression during acute low-water stress in channel catfish. *Gen. Comp. Endocrinol.* **143**:104-112.
- KASAI, M., KIYOHARA, S. (2010) Food- and light-entrainable oscillators control feeding and locomotor activity rhythms, respectively, in the Japanese catfish, *Plotosus japonicus*. *J. Comp. Physiol. A* **196**:901-912.
- KAVALIERS, M. (1980a) Pineal control of ultradian rhythms and short-term activity in a cyprinid fish, the lake chub, *Couesius plumbeus*. *Behav. Neural Biol.* **29**:224-235.
- KAVALIERS, M. (1980b) Circadian activity of the white sucker, *Catostomus commersoni*: comparison of individual and shoaling fish. *Can. J. Zool.* **58**:1399-1403.
- KAVALIERS, M. (1989) Day-night rhythms of shoaling behavior in goldfish: opioid and pineal involvement. *Physiol. Behav.* **46**:167-172.
- KAYA, O., GOKDEMIR, K., KILIC, M., BALTACI, A.K. (2006) Melatonin supplementation to rats subjected to acute swimming exercise: its effect on plasma lactate levels and relation with zinc. *Neuro. Endocrinol. Lett.* **27**:263-266.
- KELSALL, C. J., BALMENT, R. J. (1998) Native urotensins influence cortisol secretion and plasma cortisol concentration in the euryhaline flounder, *Platichthys flesus*. *Gen Comp. Endocrinol.* **112**:210-219.
- KEZUKA, H., AIDA, K., HANYU, I. (1989) Melatonin secretion from goldfish pineal gland in organ culture. *Gen. Comp. Endocrinol.* **75**:217-221.
- KEZUKA, H., IIGO, M., FURUKAWA, K., AIDA, K., HANYU, I. (1992) Effects of photoperiod, pinealectomy and ophtalmectomy on circulating melatonin rhythms in the goldfish, *Carassius auratus*. *Zool. Sci.* **9**:1047-1053.
- KHALDY, H., LEÓN, J., ESCAMES, G., BIKJDAOUENE, L., GARCÍA, J.J., ACUÑA-CASTROVIEJO, D. (2002) Circadian rhythms of dopamine and dihydroxyphenyl acetic acid in the mouse striatum: effects of pinealectomy and of melatonin treatment. *Neuroendocrinology* **75**:201-208.

- KHAN, I.A., JOY, K.P. (1988) Seasonal and daily variations in hypothalamic monoamine levels and monoamine oxidase activity in the teleost *Channa punctatus* (Bloch). *Chronobiol. Int.* **5**:311-316.
- KILIANOVA, Z., BASORA, N., KILIAN, P., PAYET, M.D., GALLO-PAYET, N. (2006) Human melanocortin receptor 2 expression and functionality: effects of protein kinase A and protein kinase C on desensitization and internalization. *Endocrinology* **147**:2325-2337.
- KINSON, G.A., SINGER, B., GRANT, L. (1968) Adrenocortical hormone secretion at various time intervals after pinealectomy in the rat. *Gen. Comp. Endocrinol.* **1**:447-449.
- KLENEROVA, V., SERY, O., HYNIE, S. (2008) Corticotropin-releasing hormone receptor subtypes in the rat anterior pituitary after two types of restraint stress. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1148**:415-420.
- KLOVINS, J., HAITINA, T., FRIDMANIS, D., KILIANOVA, Z., KAPA, I., FREDRIKSSON, R., GALLO-PAYET, N., SCHIÖTH, H.B. (2004) The melanocortin system in fugu: determination of POMC/AGRP/MCR gene repertoire and synteny, as well as pharmacology and anatomical distribution of the MCRs. *Mol. Biol. Evol.* **21**:563-579.
- KO, C.H., TAKAHASHI, J.S. (2006) Molecular components of the mammalian circadian clock. *Hum. Mol. Genet. R* **15**:271-277.
- KOBAYASHI, Y., ISHIKAWA, T., HIRAYAMA, J., DAIYASU, H., KANAI, S., TOH, H., FUKUDA, I., TSUJIMURA, T., TERADA, N., KAMEI, Y., YUBA, S., IWAI, S., TODO, T. (2000) Molecular analysis of zebrafish photolyase/cryptochrome family: two types of cryptochromes present in zebrafish. *Genes Cells* **5**:725-738.
- KOBAYASHI, Y., CHIBA, H., AMIYA, N., YAMANOME, T., MIZUSAWA, K., AMANO, M., TAKAHASHI, A. (2008) Transcription elements and functional expression of proopiomelanocortin genes in the pituitary gland of the barfin flounder. *Gen. Comp. Endocrinol.* **158**:259-267.
- KONAKCHIEVA, R., MITEV, Y., ALMEIDA, O.F.X., PATCHEV, V.K. (1997) Chronic melatonin treatment and the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in the rat: attenuation of the secretory response to stress and effects on hypothalamic neuropeptide content and release. *Biol. Cell* **89**:587-596.
- KONAKCHIEVA, R., MITEV, Y., ALMEIDA, O.F.X., PATCHEV, V.K. (1998) Chronic melatonin treatment counteracts glucocorticoid-induced dysregulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the rat. *Neuroendocrinology* **67**:171-180.
- KONTUREK, P.C., BRZOZOWSKI, T., KONTUREK, S.J. (2011) Gut clock: implication of circadian rhythms in the gastrointestinal tract. *J. Physiol. Pharmacol.* **62**:139-150.
- KOTTELAT, M. FREYHOF, J. (2007) Handbook of European freshwater fishes. Publicaciones Kottelat, Cornol, Suiza.
- KOUKKARI, W.L., SOTHERN, R.B. (2006). Chronobiometry: analyzing for rhythms. En: *Introducing biological rhythms*. Springer Science, Nueva York. pp. 577-602.

- KÜHN, E.R., CORNEILLE, S., OLLEVIER, F. (1986) Circadian variations in plasma osmolality, electrolytes, glucose, and cortisol in carp (*Cyprinus carpio*). *Gen. Comp. Endocrinol.* **61**:459-468.
- KULCZYKOWSKA, E., SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, F.J. (2010) Neurohormonal regulation of feed intake and response to nutrients in fish: aspects of feeding rhythm and stress. *Aquac. Res.* **41**:654-667.
- KULCZYKOWSKA, E., KALAMARZ, H., WARNE, J.M., BALMENT, R.J. (2006) Day-night specific binding of 2-[¹²⁵I]iodomelatonin and melatonin content in gill, small intestine and kidney of three fish species. *J. Comp. Physiol. B* **176**:277-285.
- KUSAKABE, M., TODO, T., McQUILLAN, H.J., GOETZ, F.W., YOUNG, G. (2002) Characterization and expression of steroidogenic acute regulatory protein and MLN64 cDNAs in trout. *Endocrinology* **143**:2062-2070.
- KUSAKABE, M., ZUCCARELLI, M.D., NAKAMURA, I., YOUNG, G. (2009) Steroidogenic acute regulatory protein in white sturgeon (*Acipenser transmontanus*): cDNA cloning, sites of expression and transcript abundance in corticosteroidogenic tissue after an acute stressor. *Gen. Comp. Endocrinol.* **162**:233-240.
- KUSHWAHA, N., HARWOOD, S.C., WILSON, A.M., BERGER, M., TECOTT, L.H., ROTH, B.L., ALBERT, P.R. (2006) Molecular determinants in the second intracellular loop of the 5-hydroxytryptamine-1A receptor for G protein coupling. *Mol. Pharmacol.* **69**:1518-1526.
- KWAK, S.P., MORANO, M.I., YOUNG, E.A., WATSON, S.J., AKIL, H. (1993) Diurnal CRH messenger RNA rhythm in the hypothalamus. Decreased expression in the evening is not dependent on endogenous glucocorticoids. *Neuroendocrinology* **57**:96-105.
- LAMB, C.F. (2001) Gustation and feeding behavior. En: *Food intake in fish*. Houlihan, D., Boujard, T., Jobling, M. (Eds.). Blackwell Science Ltd., Oxford. pp. 108-130.
- LAMBERT, C.M., MACHIDA, K.K., SMALE, L., NUNEZ, A.A., WEAVER, D.R. (2005) Analysis of the Prokineticin 2 system in a diurnal rodent, the unstriped Nile rat (*Arvicanthis niloticus*). *J. Biol. Rhythms* **20**:206-218.
- LANKFORD, S.E., ADAMS, T.E., CECH, J.J. (2003) Time of day and water temperature modify the physiological stress response in green sturgeon, *Acipenser medirostris*. *Comp. Biochem. Phys. A* **135**:291-302.
- LE BRAS, Y.M. (1979) Circadian rhythm in brain catecholamine concentrations in the teleost: *Anguilla anguilla* L. *Comp. Biochem. Phys. C* **62**:115-117.
- LECLERC, G.M., BOOCKFOR, F.R. (2005) Pulses of prolactin promoter activity depend on a noncanonical E-box that can bind the circadian proteins CLOCK and BMAL1. *Endocrinology* **146**:2782-2790.
- LEDER, E.H., SILVERSTEIN, J.T. (2006) The pro-opiomelanocortin genes in rainbow trout: duplications, splice variants, and differential expression. *J. Endocrinol.* **188**:355-363.

- LEMBO, P.M., GHAREMANI, M.H., MORRIS, S.J., ALBERT, P.R. (1997) A conserved threonine residue in the second intracellular loop of the 5-hydroxytryptamine 1A receptor directs signaling specificity. *Mol. Pharmacol.* **52**:164-171.
- LERNER, T.N., KREITZER, A.C. (2011) Neuromodulatory control of striatal plasticity and behaviour. *Curr. Opin. Neurobiol.* **21**:322-327.
- LESNIEWSKA, B., NOWAK, M., NUSSDORFER, G.G., MALENDOWICZ, L.K. (1990) Sex-dependent effect of melatonin on the secretory activity of rat and hamster adrenal gland *in vitro*. *Life Sci.* **47**:241-245.
- LEWY, A.J., EMENS, J.S., LEFLER, B.J., YUHAS, K., JACKMAN, A.R. (2005) Melatonin entrains free-running blind people according to a physiological dose-response curve. *Chronobiol. Int.* **22**:1093-1106.
- LI, Y.-Y., INOUE, K., TAKEI, Y. (2003) Steroidogenic Acute Regulatory protein in eels: cDNA cloning and effects of ACTH and seawater transfer on its mRNA expression. *Zool. Sci.* **20**:211-219.
- LI, X.M., BEAU, J., DELAGRANGE, P., MOCAËR, E., LÉVI, F. (2004) Circadian rhythm entrainment with melatonin, melatonin receptor antagonist S22153 or their combination in mice exposed to constant light. *J. Pineal Res.* **37**:176-184.
- LIEBERT, A.M., SCHRECK, C.B. (2006) Effects of acute stress on osmoregulation, feed intake, IGF-1, and cortisol in yearling steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*) during seawater adaptation. *Gen. Comp. Endocrinol.* **148**:195-202.
- LIGHTMAN, S.L., WILES, C.C., ATKINSON, H.C., HENLEY, D.E., RUSSELL, G.M., LEENDERTZ, J.A., MCKENNA, M.A., SPIGA, F., WOOD, S.A., CONWAY-CAMPBELL, B.L. (2008) The significance of glucocorticoid pulsatility. *Eur. J. Pharmacol.* **583**:255-262.
- LIU, C., WEAVER, D.R., JIN, X., SHEARMAN, L.P., PIESCHL, R.L., GRIBKOFF, V.K., REPPERT, S.M. (1997) Molecular dissection of two distinct actions of melatonin on the suprachiasmatic circadian clock. *Neuron* **19**:91-102.
- LIVAK, K.J., SCHMITTGEN, T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-delta delta C(T)) method. *Methods* **25**:402-408.
- LÓPEZ-OLMEDA, J.F., MADRID, J.A., SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, F.J. (2006a) Melatonin effects on food intake and activity rhythms in two fish species with different activity patterns: diurnal (goldfish) and nocturnal (tench). *Comp. Biochem. Phys. A* **144**:180-187.
- LÓPEZ-OLMEDA, J.F., MADRID, J.A., SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, F.J. (2006b) Light and temperature cycles as *zeitgebers* of zebrafish (*Danio rerio*) circadian activity rhythms. *Chronobiol. Int.* **23**:537-550.
- LÓPEZ-OLMEDA, J.F., TARTAGLIONE, E.V., DE LA IGLESIA, H.O., SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, F.J. (2010) Feeding entrainment of food-anticipatory activity and *per1* expression in the brain and liver of zebrafish under different lighting and feeding conditions. *Chronobiol. Int.* **27**:1380-1400.
- LÓPEZ-OLMEDA, J.F., BLANCO-VIVES, B., PUJANTE, I.M., WUNDERINK, Y.S., MANCERA, J.M., SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, F.J. (2013) Daily rhythms in the

hypothalamus-pituitary-interrenal axis and acute stress responses in a teleost flatfish, *Solea senegalensis*. *Chronobiol. Int.* En fase de imprenta.

- LÓPEZ-PATIÑO, M.A., ALONSO-GÓMEZ, A.L., GUIJARRO, A., ISORNA, E., DELGADO, M.J. (2008) Melatonin receptors in brain areas and ocular tissues of the teleost *Tinca tinca*: Characterization and effect of temperature. *Gen. Comp. Endocrinol.* **155**:847-856.
- LÓPEZ-PATIÑO, M.A., RODRÍGUEZ-ILLAMOLA, A., CONDE-SIEIRA, M., MÍGUEZ, J.M. (2011) Daily rhythmic expression patterns of *Clock1a*, *Bmal1*, and *Per1* genes in retina and hypothalamus of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Chronobiol. Int.* **28**:381-389.
- LÓPEZ-PATIÑO, M.A., GUIJARRO, A.I., ALONSO-GÓMEZ, A.L., DELGADO, M.J. (2012) Characterization of two different melatonin binding sites in peripheral tissues of the teleost *Tinca tinca*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **175**:180-187.
- LÓPEZ-PATIÑO, M.A., CONDE-SIEIRA, M., GESTO, M., LIBRÁN-PÉREZ, M., SOENGAS, J.L., MÍGUEZ, J.M. (2013) Melatonin partially minimizes the adverse effects of stress in Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Aquaculture* **388-391**:165-172.
- LOVEJOY, D.A., BALMENT, R.J. (1999) Evolution and physiology of the corticotropin-releasing factor (CRF) family of neuropeptides in vertebrates. *Gen. Comp. Endocrinol.* **115**:1-22.
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**:265-275.
- LU, W., DOW, L., GUMUSGOZ, S., BRIERLEY, M.J., WARNE, J.M., MCCROHAN, C.R., BALMENT, R.J., RICCARDI, D. (2004) Coexpression of corticotropin-releasing hormone and urotensin I precursor genes in the caudal neurosecretory system of the euryhaline flounder (*Platichthys flesus*): a possible shared role in peripheral regulation. *Endocrinology* **145**:5786-5797.
- LUMINEAU, S., GUYOMARCH, C., VIVIEN-ROELS, B., HOUELIER, C. (2002) Cyclic melatonin synchronises the circadian rhythm of feeding activity in Japanese quail, *Coturnix japonica*. *C. R. Biol.* **325**:205-212.
- MADRID, J.A., BOUJARD, T., SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, F.J. (2001) Feeding rhythms. En: *Food intake in fish*. Houlihan, D., Boujard, T., Jobling, M. (Eds.). Blackwell Science Ltd., Oxford. pp. 189-215.
- MAILLIET, F., FERRY, G., VELLA, F., BERGER, S., COGÉ, F., CHOMARAT, P., MALLET, C., GUÉNIN, S.-P., GUILLAUMET, G., VIAUD-MASSUARD, M.-C., YOUS, S., DELAGRANGE, P., BOUTIN, J.A. (2005) Characterization of the melatonergic MT3 binding site on the NRH quinone oxidoreductase 2 enzyme. *Biochem. Pharmacol.* **71**:74-88.
- MALKOSKI, S.P., DORIN, R.I. (1999) Composite glucocorticoid regulation at a functionally defined negative glucocorticoid response element of the human corticotropin-releasing hormone gene. *Mol. Endocrinol.* **13**:1629-1644.
- MANDADO, M., MOLIST, P., ANADÓN, R., YÁÑEZ, J. (2001) A dil-tracing study of the neural connections of the pineal organ in two elasmobranchs (*Scyliorhinus canicula*

- and *Raja montagu*) suggests a pineal projection to the midbrain GnRH-immunoreactive nucleus. *Cell Tissue Res.* **303**:391-401.
- MANIAM, J., MORRIS, M.J. (2012) The link between stress and feeding behaviour. *Neuropharmacology* **63**:97-110.
 - MÁRQUEZ DE PRADO, B., CASTAÑEDA, T.R., GALINDO, A., DEL ARCO, A., SEGOVIA, G., REITER, R.J., MORA, F. (2000) Melatonin disrupts circadian rhythms of glutamate and GABA in the neostriatum of the awake rat: a microdialysis study. *J. Pineal Res.* **29**:209-216.
 - MARSHALL, R.D. (1972) Glycoproteins. *Annu. Rev. Biochem.* **41**:673-702.
 - MARTÍN-ROBLES, Á.J., ISORNA, E., WHITMORE, D., MUÑOZ-CUETO, J.A., PENDÓN, C. (2011) The clock gene Period3 in the nocturnal flatfish *Solea senegalensis*: molecular cloning, tissue expression and daily rhythms in central areas. *Comp. Biochem. Physiol. A* **159**:7-15.
 - MARTÍN-ROBLES, Á.J., WHITMORE, D., SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, F.J., PENDÓN, C., MUÑOZ-CUETO, J.A. (2012) Cloning, tissue expression pattern and daily rhythms of Period1, Period2, and Clock transcripts in the flatfish Senegalese sole, *Solea senegalensis*. *J. Comp. Physiol. B* **182**:673-685.
 - MARTINET, L., GUARDIOLA-LEMAITRE, B., MOCAER, E. (1996) Entrainment of circadian rhythms by S-20098, a melatonin agonist, is dose and plasma concentration dependent. *Pharmacol. Biochem. Be.* **54**:713-718.
 - MARTÍNEZ-ÁLVAREZ, R.M., DE PEDRO, N., GUIJARRO, A., ALONSO-GÓMEZ, A.L., ISORNA, E., DELGADO, M.J. (2004) Efecto de la melatonina sobre el peso corporal y las reservas metabólicas del carpín dorado (*Carassius auratus*). III Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura. pp. 746-755.
 - MARTINS, C.I.M., SCHRAMA, J.W., VERRETH, J.A.J. (2006) The effect of group composition on the welfare of African catfish (*Clarias gariepinus*). *Appl. Anim. Behav. Sci.* **97**:323-334.
 - MARUMOTO, N., MURAKAMI, N., KATAYAMA, T., KURODA, H., MURAKAMI, T. (1996) Effects of daily injections of melatonin on locomotor activity rhythms in rats maintained under constant bright or dim light. *Physiol. Behav.* **60**:767-773.
 - MASUBUCHI, S., HONMA, S., ABE, H., ISHIZAKI, K., NAMIHIRA, M., IKEDA, M., HONMA, K. (2000) Clock genes outside the suprachiasmatic nucleus involved in manifestation of locomotor activity rhythm in rats. *Eur. J. Neurosci.* **12**:4206-4214.
 - MASUDA, K., ZHDANOVA, I.V. (2010) Intrinsic activity rhythms in *Macaca mulatta*: their entrainment to light and melatonin. *J. Biol. Rhythms* **25**:361-371.
 - MAZEPA, R.C., CUEVAS, M.J., COLLADO, P.S., GONZÁLEZ-GALLEGO, J. (2000) Melatonin increases muscle and liver glycogen content in nonexercised and exercised rats. *Life Sci.* **66**:153-160.
 - MAZURAS, D., BRIERLEY, I., ANGLADE, I., DREW, J., RANDALL, C., BROMAGE, N., MICHEL, D., KAH, O., WILLIAMS, L.M. (1999) Central melatonin receptors in the rainbow trout: comparative distribution of ligand binding and gene expression. *J. Comp. Neurol.* **409**:313-324.

- MAZURAS, D., LE DRÉAN, G., BRIERLEY, I., ANGLADE, I., BROMAGE, N., WILLIAMS, L.M., KAH, O. (2000) Expression of clock genes in the brain of rainbow trout: comparison with the distribution of melatonin receptors. *J. Comp. Neurol.* **422**:612-620.
- McEWEN, B.S., SAPOLSKY, R.M. (1999) Stress. En: *The MIT encyclopedia of the cognitive sciences*. Wilson, R.A., Keil, F. (Eds.). MIT Press, Cambridge.
- MEEK, J. (1994) Catecholamines in the brains of Osteichthyes (bony fishes). En: *Phylogeny and development of catecholamine systems in the CNS of vertebrates*. Smeets, W.J.A.J., Reiner, A. (Eds.). Cambridge University Press. pp. 49-76.
- MEHDI, A.Z., SANDOR, T. (1977) The effect of melatonin on the biosynthesis of corticosteroids in beef adrenal preparations *in vitro*. *J. Steroid Biochem.* **8**:821-823.
- MEIER, A.H. (1976) Daily variation in concentration of plasma corticosteroid in hypophysectomized rats. *Endocrinology* **98**:1475-1479.
- MENAKER, M., MOREIRA, L.F., TOSINI, G. (1997) Evolution of circadian organization in vertebrates. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **30**:305-313.
- MESSENGER, S., HAZLERIGG, D.G., MERCER, J.G., MORGAN, P.J. (2000) Photoperiod differentially regulates the expression of *Per1* and *ICER* in the pars tuberalis and the suprachiasmatic nucleus of the Siberian hamster. *Eur. J. Neurosci.* **12**:2865-2870.
- MESSENGER, S., GARABETTE, M.L., HASTINGS, M.H., HAZLERIGG, D.G. (2001) Tissue-specific abolition of *Per1* expression in the pars tuberalis by pinealectomy in the Syrian hamster. *Neuroendocrinology* **12**:579-582.
- METZ, J.R., HUISING, M.O., MEEK, J., TAVERNE-THIELE, A.J., WENDELAAR BONGA, S.E., FLIK, G. (2004) Localization, expression and control of adrenocorticotrophic hormone in the nucleus preopticus and pituitary gland of common carp (*Cyprinus carpio* L.). *J. Endocrinol.* **182**:23-31.
- METZ, J.R., GEVEN, E.J.W., VAN DEN BURG, E.H., FLIK, G. (2005) ACTH, α -MSH, and control of cortisol release: cloning, sequencing, and functional expression of the melanocortin-2 and melanocortin-5 receptor in *Cyprinus carpio*. *Am. J. Physiol.-Reg. I.* **289**:814-826.
- MIGAUD, H., DAVIE, A., MARTÍNEZ-CHAVEZ, C.C., AL-KHAMEES, S. (2007) Evidence for differential photic regulation of pineal melatonin synthesis in teleost. *J. Pineal Res.* **43**:327-335.
- MÍGUEZ, J.M., SIMONNEAUX, V., PÉVET, P. (1995) Evidence for a regulatory role of melatonin on serotonin release and uptake in the pineal gland. *J. Neurochem.* **7**:949-956.
- MÍGUEZ, J.M., MARTIN, F.J., LEMA, M., ALDEGUNDE, M. (1996) Changes in serotonin level and turnover in discrete hypothalamic nuclei after pinealectomy and melatonin administration to rats. *Neurochem. Int.* **29**:651-658.
- MÍGUEZ, J.M., MARTÍN, F.J., ALDEGUNDE, M. (1997) Melatonin effects on serotonin synthesis and metabolism in the striatum, nucleus accumbens, and dorsal and median raphe nuclei of rats. *Neurochem. Res.* **22**:87-92.

- MILLINGTON, G.W.M. (2007) The role of proopiomelanocortin (POMC) neurones in feeding behaviour. *Nutr. Metab.* **4**:18-33.
- MILTON, J.S. (2007) *Estadística para biología y ciencias de la salud*. 3ª edición. McGraw-Hill-Interamericana. pp. 492-494.
- MOK, E.Y., MUNRO, A.D. (1998) Effects of dopaminergic drugs on locomotor activity in teleost fish of the genus *Oreochromis* (Cichlidae): involvement of the telencephalon. *Physiol. Behav.* **64**:227-234.
- MOMMSEN, T.P., VIJAYAN, M.M., MOON, T.W. (1999) Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. *Rev. Fish Biol. Fisher.* **9**:211-268.
- MONNET, F.P. (2002) Melatonin modulates [³H]serotonin release in the rat hippocampus: effects of circadian rhythm. *J. Neuroendocrinol.* **14**:194-199.
- MONTOYA, A., LÓPEZ-OLMEDA, J.F., GARAYZAR, A.B.S., SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, F.J. (2010) Synchronization of daily rhythms of locomotor activity and plasma glucose, cortisol and thyroid hormones to feeding in gilthead seabream (*Sparus aurata*) under a light-dark cycle. *Physiol. Behav.* **101**:101-107.
- MONTOYA, A., MOLINER, J., PUJANTE, I., MANCERA, J.M., SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, F.J. (2011) Time of day affects the acute stress responses of gilthead sea bream *Sparus aurata*. En: *Avances en endocrinología comparada*. Vol. VI. Delgado, M.J., Alonso-Gómez, A.L., De Pedro, N., Isorna, E. (Eds.). Servicio de Publicaciones Universidad Complutense de Madrid. pp. 156-158.
- MOORE, S.A., PATEL, A.S., HUANG, N., LAVIN, B.C., GRAMMATOPOULOS, T.N., ANDRES, R.D., WEYHENMEYER, J.A. (2002) Effects of mutations in the highly conserved DRY motif on binding affinity, expression, and G-protein recruitment of the human angiotensin II type-2 receptor. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **109**:161-167.
- MORALES, A.E., CARDENETE, G., ABELLÁN, E., GARCÍA-REJÓN, L. (2005) Stress-related physiological responses to handling in common dentex (*Dentex dentex* Linnaeus, 1758). *Aquac. Res.* **36**:33-40.
- MORENO, M.L., VILLANUA, M.A., ESQUIFINO, A.I. (1992) Serum prolactin and luteinizing hormone levels and their activities of hypothalamic monoamine oxidase A and B and phenylethanolamine- N-methyltransferase are changed during sexual maturation in male rats treated neonatally with melatonin. *J. Pineal Res.* **13**:167-173.
- MROSOVSKY, N., EDELSTEIN, K., HASTINGS, M.H., MAYWOOD, E.S. (2001) Cycle of period gene expression in a diurnal mammal (*Spermophilus tridecemlineatus*): implications for nonphotic phase shifting. *J. Biol. Rhythms* **16**:471-478.
- MUNRO, A.D. (1986) The effects of apomorphine, D-amphetamine and chlorpromazine on the aggressiveness of isolated *Aequidens pulcher* (Teleostei Cichlidae). *Psychopharmacology* **88**:124-128.
- MURAKAMI, N., KAWANO, T., NAKAHARA, K., NASU, T., SHIOTA, K. (2001) Effect of melatonin on circadian rhythm, locomotor activity and body temperature in the intact house sparrow, Japanese quail and owl. *Brain Res.* **889**:220-224.
- MUSS, B.J., DAHLSTRÖM, P. (1981) Los peces de agua dulce de España y Europa. Omega, Barcelona. pp. 134, 222.

- NADER, N., CHROUSOS, G.P., KINO, T. (2010) Interactions of the circadian clock system and the HPA axis. *Trends Endocrin. Met.* **21**:277-286.
- NAKAHARA, K., KAWANO, T., SHIOTA, K., MURAKAMI, N. (2003) Effects of microinjection of melatonin into various brain regions of Japanese quail on locomotor activity and body temperature. *Neurosci. Lett.* **345**:117-120.
- NAKAO, N., YASUO, S., NISHIMURA, A., YAMAMURA, T., WATANABE, T., ANRAKU, T., OKANO, T., FUKADA, Y., SHARP, P.J., EBIHARA, S., YOSHIMURA, T. (2007) Circadian clock gene regulation of steroidogenic acute regulatory protein gene expression in preovulatory ovarian follicles. *Endocrinology* **148**:3031-3038.
- NEMATOLLAHI, M.A., VAN PELT-HEERSCHAP, H., KOMEN, J. (2009) Transcript levels of five enzymes involved in cortisol synthesis and regulation during the stress response in common carp: relationship with cortisol. *Gen. Comp. Endocrinol.* **164**:85-90.
- NEMATOLLAHI, M.A., VAN PELT-HEERSCHAP, H., ATSMAN, W., KOMEN, J. (2012) High levels of corticosterone, and gene expression of *star*, *cyp17a2*, *hsd3b*, *cyp21*, *hsd11b2* during acute stress in common carp with interrenal hyperplasia. *Gen. Comp. Endocrinol.* **176**:252-258.
- NEVEU, A. (1991) Stratégie alimentaire de la truite commune (*Salmo trutta*), en eaux courantes. En: *La truite: biologie et écologie*. Baglinière, J.L., Maisse, G. (Eds.). INRA, Paris. pp. 97-120.
- NIKAIDO, Y., ALURU, N., MCGUIRE, A., PARK, Y.-J., VIJAYAN, M.M., TAKEMURA, A. (2010) Effect of cortisol on melatonin production by the pineal organ of tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Comp. Biochem. Phys. A* **155**:84-90.
- NISEMBAUM, L.G., VELARDE, E., TINOCO, A.B., AZPELETA, C., DE PEDRO, N., ALONSO-GÓMEZ, A.L., DELGADO, M.J., ISORNA, E. (2012) Light-dark cycle and feeding time differentially entrains the gut molecular clock of the goldfish (*Carassius auratus*). *Chronobiol. Int.* **29**:665-673.
- NOAKES, D.L.G., LEATHERLAND, J.F. (1977) Social dominance and interrenal cell activity in rainbow trout, *Salmo gairdneri* (Pisces, Salmonidae). *Environ. Biol. Fishes* **2**:131-136.
- NOESKE, T.A., SPIELER, R.E. (1983) Photoperiod and diel variations of serum cortisol, thyroxine and protein in goldfish, *Carassius auratus* L. *J. Fish Biol.* **23**:705-710.
- NORRIS, D.O. (1997) Vertebrate endocrinology. 3ª edición. Academic Press, San Diego.
- NOSJEAN, O., FERRO, M., COGÉ, F., BEAUVERGET, P., HENLIN, J.-M., LEFOULON, F., FAUCHÈRE, J.-L., DELAGRANGE, P., CANET, E., BOUTIN, J.A. (2000) Identification of the melatonin-binding site MT3 as the quinone reductase 2. *J. Biol. Chem.* **275**:31311-31317.
- NUNEZ, S., TRANT, J.M. (1999) Regulation of interrenal gland steroidogenesis in the Atlantic stingray (*Dasyatis sabina*). *J. Exp. Zool.* **284**:517-525.
- OGLE, T.F., KITAY, J.I. (1976) Effects of pinealectomy on adrenal function *in vivo* and *in vitro* in female rats. *Endocrinology* **98**:20-24.

- OIKE, H., NAGAI, K., FUKUSHIMA, T., ISHIDA, N., KOBORI, M. (2011) Feeding cues and injected nutrients induce acute expression of multiple clock genes in the mouse liver. *PLoS One* **6**:e23709.
- OJIMA, D., IWATA, M. (2010) Central administration of growth hormone-releasing hormone and corticotropin-releasing hormone stimulate downstream movement and thyroxine secretion in fall-smolting coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Gen. Comp. Endocrinol.* **168**:82-87.
- OLSEN, R.E., SUNDELL, K., MAYHEW, T.M., MYKLEBUST, R., RINGØ, E. (2005) Acute stress alters intestinal function of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquaculture* **250**:480-495.
- OLSEN, R.E., SUNDELL, K., RINGØ, E., MYKLEBUST, R., HEMRE, G.-I., HANSE, T., KARLSEN, Ø. (2008) The acute stress response in fed and food deprived Atlantic cod, *Gadus morhua* L. *Aquaculture* **280**:232-241.
- ORTH, D., KOVACS, W. (1998) The adrenal cortex. En: *Williams textbook of endocrinology*. Wilson, J., Foster, D., Kronenberg, H., Reed-Larsen, P. (Eds.). WB Saunders Co., Philadelphia. pp. 517-664.
- OSTER, H., DAMEROW, S.S., HUT, R.A., EICHELE, G. (2006a) Transcriptional profiling in the adrenal gland reveals circadian regulation of hormone biosynthesis genes and nucleosome assembly genes. *J. Biol. Rhythms* **21**:350-361.
- OSTER, H., DAMEROW, S.S., KIESSLING, S., JAKUBCAKOVA, V., ABRAHAM, D., TIAN, J., HOFFMANN, M.W., EICHELE, G. (2006b) The circadian rhythm of glucocorticoids is regulated by a gating mechanism residing in the adrenal cortical clock. *Cell Metab.* **4**:163-173.
- OSTERLUND, C., SPENCER, R.L. (2011) Corticosterone pretreatment suppresses stress-induced hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity via multiple actions that vary with time, site of action, and *de novo* protein synthesis. *J. Endocrinol.* **208**:311-322.
- OTSUKA, T., GOTO, M., KAWAI, M., TOGO, Y., SATO, K., KATOH, K., FURUSE, M., YASUO, S. (2012) Photoperiod regulates corticosterone rhythms by altered adrenal sensitivity via melatonin-independent mechanisms in Fischer 344 rats and C57BL/6J mice. *PLOS One* **7**:e39090.
- ØVERLI, Ø., WINBERG, S., DAMSGÅRD, B., JOBLING, M. (1998) Food intake and spontaneous swimming activity in Arctic charr (*Salvelinus alpinus*): role of brain serotonergic activity and social interactions. *Can. J. Zoolog.* **76**:1366-1370.
- ØVERLI, Ø., HARRIS, C.A., WINBERG, S. (1999) Short-term effects of fights for social dominance and the establishment of dominant-subordinate relationships on brain monoamines and cortisol in rainbow trout. *Brain Behav. Evol.* **54**:263-275.
- ØVERLI, Ø., POTTINGER, T.G., CARRICK, T.R., ØVERLI, E., WINBERG, S. (2001) Brain monoaminergic activity in rainbow trout selected for high and low stress responsiveness. *Brain Behav. Evol.* **57**:214-224.
- ØVERLI, Ø., KOTZIAN, S., WINBERG, S. (2002) Effects of cortisol on aggression and locomotor activity in rainbow trout. *Horm. Behav.* **42**:53-61.

- ØVERLI, Ø., WINBERG, S., POTTINGER, T.G. (2005) Behavioral and neuroendocrine correlations of selection for stress responsiveness in rainbow trout-a review. *Integr. Comp. Biol.* **45**:463-474.
- PANDA, S., HOGENESCH, J.B., KAY, S.A. (2002) Circadian rhythms from flies to human. *Nature* **417**:329-335.
- PANDO, M.P., PINCHAK, A.B., CERMAKIAN, N., SASSONE-CORSI, P. (2001) A cell-based system that recapitulates the dynamic light-dependent regulation of the vertebrate clock. *PNAS* **98**:10178-10183.
- PANKHURST, N.W., KING, H.R., LUDKE, S.L. (2008) Relationship between stress, feeding and plasma ghrelin levels in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Mar. Freshwat. Behav. Physiol.* **41**:53-64.
- PARK, Y.-J., PARK, K.S., KIM, J.H., SHIN, C.S., KIM, S.Y., LEE, H.K. (1999) Reproducibility of the cortisol response to stimulation with the low dose (1 microgram) of ACTH. *Clin. Endocrinol.* **51**:153-158.
- PARK, Y.-J., PARK, J.-G., HIYAKAWA, N., LEE, Y.-D., KIM, S.-J., TAKEMURA, A. (2007) Diurnal and circadian regulation of a melatonin receptor, MT1, in the golden rabbitfish, *Siganus guttatus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **150**:253-262.
- PAULSON, P.E., ROBINSON, T.E. (1994) Relationship between circadian changes in spontaneous motor activity and dorsal versus ventral striatal dopamine neurotransmission assessed with on-line microdialysis. *Behav. Neurosci.* **108**:624-635.
- PAVLIDIS, M., GREENWOOD, L., PAALAVUO, M., MOLSA, H., LAITINEN, J.T. (1999) The effect of photoperiod on diel rhythms in serum melatonin, cortisol, glucose, and electrolytes in the common dentex, *Dentex dentex*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **113**:240-250.
- PAYNE, A.H., HALES, D.B. (2004) Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones. *Endocr. Rev.* **25**:947-970.
- PEIRSON, S.N., BUTLER, J.N., DUFFIELD, G.E., TAKHER, S., SHARMA, P., FOSTER, R.G. (2006) Comparison of clock gene expression in SCN, retina, heart, and liver of mice. *Biochem. Bioph. Res. Co.* **351**:800-807.
- PENHOAT, A., NAVILLE, D., BEGEOT, M. (2001) The adrenocorticotrophic hormone receptor. *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes* **8**:112-117.
- PEPELS, P.P.L.M., VAN HELVOORT, H., WENDELAAR BONGA, S.E., BALM, P.H.M. (2004) Corticotropin-releasing hormone in the teleost stress response: rapid appearance of the peptide in plasma of tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *J. Endocrinol.* **180**:425-438.
- PERSENGIEV, S.P., KANCHEV, L.N., STANKOV, B.M. (1989) Effect of melatonin on steroid production by rat adrenals under *in vitro* superfusion conditions. *Life Sci.* **44**:1955-1962.
- PETER, R.E. (1968) Failure to detect an effect of pinealectomy in goldfish. *Gen. Comp. Endocrinol.* **10**:443-449.

- PETER, R. E., HONTELA, A., COOK, A. F., PAULENCU, C. R. (1978). Daily cycles in serum cortisol levels in the goldfish: effects of photoperiod, temperature, and sexual condition. *Can. J. Zool.* **56**:2443-2448.
- PETERSON, B.C., SMALL, B.C. (2004) Effects of fasting on circulating IGF-binding proteins, glucose, and cortisol in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Domest. Anim. Endocrin.* **26**:231-240.
- PÉVET, P., CHALLET, E. (2011) Melatonin: both master clock output and internal time-giver in the circadian clocks network. *J. Physiol.* **105**:170-182.
- PEZÜK, P., MOHAWK, J.A., WANG, L.A., MENAKER, M. (2012) Glucocorticoids as entraining signals for peripheral circadian oscillators. *Endocrinology* **153**:4775-4783.
- PICCINETTI, C.C., MIGLIARINI, B., OLIVOTTO, I., COLETTI, G., AMICI, A., CARNEVALI, O. (2010) Appetite regulation: the central role of melatonin in *Danio rerio*. *Horm. Behav.* **58**:780-785.
- PICKERING, A.D., POTTINGER, T.G. (1983) Seasonal and diel changes in plasma cortisol levels of the brown trout, *Salmo trutta* L. *Gen. Comp. Endocrinol.* **49**:232-239.
- PIERPAOLI, W., MAESTRONI, G. (1987) Melatonin, a principal neuroimmunoregulatory and anti-stress hormone: its antiaging effects. *Immunol. Lett.* **16**:355-362.
- PINILLOS, M.L., DE PEDRO, N., ALONSO-GÓMEZ, A.L., ALONSO-BEDATE, M., DELGADO, M.J. (2001) Food intake inhibition by melatonin in goldfish (*Carassius auratus*). *Physiol. Behav.* **72**:629-634.
- POIREL, V.J., CAILOTTO, C., STREICHER, D., PEVET, P., MASSON-PEVET, M., GAUER, F. (2003) MT1 melatonin receptor mRNA tissular localization by PCR amplification. *Neuroendocrinol. Lett.* **24**:33-38.
- POLAKOF, S., CEINÓS, R., FERNÁNDEZ-DURÁN, B., MÍGUEZ, J.M., SOENGAS, J.L. (2007) Daily changes in parameters of energy metabolism in brain of rainbow trout: dependence on feeding. *Comp. Biochem. Phys. A* **146**:265-273.
- POLAKOF, S., PANSERAT, S., SOENGAS, J.L., MOON, T.W. (2012) Glucose metabolism in fish: a review. *J. Comp. Physiol. B* **182**:1015-1045.
- PONCET, L., DENOROY, L., JOUVET, M. (1993) Daily variations in in vivo tryptophan hydroxylation and in the contents of serotonin and 5-hydroxyindoleacetic acid in discrete brain areas of the rat. *J. Neural Transm.-Gen.* **92**:137-150.
- PORTER, M.J.R., RANDALL, C.F., BROMAGE, N.R., THORPE, J.E. (1998) The role of melatonin and the pineal gland on development and smoltification of Atlantic salmon (*Salmo salar*) parr. *Aquaculture* **168**:139-155.
- POTTINGER, T.G. (2008) The stress response in fish - Mechanisms, effects and measurement. En: *Fish Welfare*. Branson, E.J. (Ed.). pp. 32-48.
- POTTINGER, T.G. (2010) A multivariate comparison of the stress response in three salmonid and three cyprinid species: evidence for inter-family differences. *J. Fish Biol.* **76**:601-621.

- POTTINGER, T.G., CARRICK, T.R. (1999) A comparison of plasma glucose and plasma cortisol as selection markers for high and low stress-responsiveness in female rainbow trout. *Aquaculture* **175**:351-363.
- POTTINGER, T.G., CARRICK, T.R. (2001) ACTH does not mediate divergent stress responsiveness in rainbow trout. *Comp. Biochem. Phys. A* **129**:399-404.
- POTTINGER, T.G., RAND-WEAVER, M., SUMPTER, J.P. (2003) Overwinter fasting and re-feeding in rainbow trout: plasma growth hormone and cortisol levels in relation to energy mobilization. *Comp. Biochem. Physiol. A* **136**:403-417.
- PRUNET, P., STURM, A., MILLA, S. (2006) Multiple corticosteroid receptors in fish: from old ideas to new concepts. *Gen. Comp. Endocrinol.* **147**:17-23.
- QUABIUS, E.S., BALM, P.H.M., WENDELAAR BONGA, S.E. (1997) Interrenal stress responsiveness of tilapia (*Oreochromis mossambicus*) is impaired by dietary exposure to PCB126. *Gen. Comp. Endocrinol.* **108**:472-482.
- RANCE, T.A., BAKER, B.I., WEBLEY, G. (1982) Variations in plasma cortisol concentrations over a 24-hour period in the rainbow trout *Salmo gairdneri*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **48**:269-274.
- RANDALL, D.J., PERRY, S.F. (1992) Catecholamines. En: *Fish physiology*. Hoar, W.S., Randall, D.J., Farrell, A.P. (Eds.). Academic, San Diego. pp. 255-300.
- RAO, N.V.A., RAZA, B., PRASAD, J.K., RAZI, S.S., GOTTARDO, L., AHMAD, M.F., NUSSDORFER, G.G. (2001) Melatonin decreases glucocorticoid blood concentration in the rat and palm squirrel, acting directly on the adrenal gland. *Biomed. Res.* **22**:115-117.
- REDGATE, E. S. (1974) Neural control of pituitary-adrenal activity in *Cyprinus carpio*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **22**:35-41.
- REDMAN, J., ARMSTRONG, S., NG, K.T. (1983) Free-running activity rhythms in the rat: entrainment by melatonin. *Science* **219**:1089-1091.
- REDMAN, J.R., GUARDIOLA-LEMAITRE, B., BROWN, M., DELAGRANGE, P., ARMSTRONG, S.M. (1995) Dose dependent effects of S-20098, a melatonin agonist, on direction of re-entrainment of rat circadian activity rhythms. *Psychopharmacology* **118**:385-390.
- REITER, R.J. (1973) Comparative physiology: pineal gland. *Annu. Rev. Physiol.* **35**:305-328.
- REITER, R.J. (1991) Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. *Endocr. Rev.* **12**:151-180.
- REITER, R.J. (1993) The melatonin rhythm: both a clock and a calendar. *Experientia* **49**:654-664.
- REITER, R.J., TAN, D.-X., FUENTES-BROTO, L. (2010) Melatonin: a multitasking molecule. *Prog. Brain Res.* **181**:127-151.
- RENSING, L., RUOFF, P. (2002) Temperature effect on entrainment, phase shifting, and amplitude of circadian clocks and its molecular bases. *Chronobiol. Int.* **19**:87-864.

- REPPERT, S.M., WEAVER, D.R., CASSONE, V.M., GODSON, C., KOLAKOWSKY Jr., L.F. (1995) Melatonin receptors are in birds: molecular analysis of two receptor subtypes differentially expressed in chicken brain. *Neuron* **15**:1003-1015.
- REPPERT, S.M., WEAVER, D.R., GODSON, C. (1996) Melatonin receptors step into the light: cloning and classification of subtypes. *Trends Pharmacol. Sci.* **17**:100-102.
- RICHTER, H.G., TORRES-FARFÁN, C., GARCÍA-SESNICH, J., ABARZÚA-CATALÁN, L., HENRIQUEZ, M.G., ÁLVAREZ-FELMER, M., GAETE, F., REHREN, G.E., SERÓN-FERRÉ, M. (2008) Rhythmic expression of functional MT1 melatonin receptors in the rat adrenal gland. *Endocrinology* **149**:995-1003.
- RODRÍGUEZ-SOLÍS, J.M., COSTA, J.C., MIRALLES, L., MUÑOZ, Á., GUIJARRO, R. (2005) Agentes Medioambientales de la Generalitat Valenciana. Vol. II. MAD, Sevilla. pp. 125.
- ROTLLANT, J., ARENDS, R.J., MANCERA, J.M., FLIK, G., WENDELAAR BONGA, S.E., TORT, L. (2000a) Inhibition of HPI axis response to stress in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) with physiological plasma levels of cortisol. *Fish Physiol. Biochem.* **23**:13-22.
- ROTLLANT, J., BALM, P.H.M., RUANE, N.M., PÉREZ-SÁNCHEZ, J., WENDELAAR-BONGA, S.E., TORT, L. (2000b) Pituitary proopiomelanocortin-derived peptides and hypothalamus-pituitary-interrenal axis activity in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) during prolonged crowding stress: differential regulation of adrenocorticotropin hormone and α -melanocyte-stimulating hormone release by corticotropin-releasing hormone and thyrotropin-releasing hormone. *Gen. Comp. Endocrinol.* **119**:152-163.
- ROTLLANT, J., BALM, P.H.M., PÉREZ-SÁNCHEZ, J., WENDELAAR-BONGA, S.E., TORT, L. (2001) Pituitary and interrenal function in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L., Teleostei) after handling and confinement stress. *Gen. Comp. Endocrinol.* **121**:333-342.
- ROTLLANT, J., RUANE, N.M., CABALLERO, M.J., MONTERO, D., TORT, L. (2003) Response to confinement in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) is characterised by an increased biosynthetic capacity of interrenal tissue with no effect on ACTH sensitivity. *Comp. Biochem. Phys. A* **136**:613-620.
- ROTLLANT, J., RUANE, N.M., DINIS, M.T., CANARIO, A.V.M., POWER, D.M. (2006) Intra-adrenal interactions in fish: catecholamine stimulated cortisol release in sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Comp. Biochem. Physiol. A* **143**:375-381.
- ROVATI, G.E., CAPRA, V., NEUBIG, R.R. (2007) The highly conserved DRY motif of class A G protein-coupled receptors: beyond the ground state. *Mol. Pharmacol.* **71**:959-964.,
- ROY, S., ROY, S.J., PINARD, S., TAILLEFER, L.-D., RACHED, M., PARENT, J.-L., GALLO-PAYET, N. (2011) Mechanisms of melanocortin-2 receptor (MC2R) internalization and recycling in human embryonic kidney (HEK) cells: identification of key Ser/Thr (S/T) amino acids. *Mol. Endocrinol.* **25**:1961-1977.
- ROY, S., ROY, S.J., PINARD, S., AGULLEIRO, M.J., CERDÁ-REVERTER, J.M., PARENT, J.L., GALLO-PAYET, N. (2012) The C-terminal domains of melanocortin-2 receptor (MC2R) accessory proteins (MRAP1) influence their localization and ACTH-induced cAMP production. *Gen. Comp. Endocrinol.* **176**:265-274.

- ROZEN, S., SKALETISKY, H. (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol. Biol.* **132**:365-386.
- RUANE, N.M., HUISMAN, E.A., KOMEN, J. (2002) The influence of feeding history on the acute stress response of common carp (*Cyprinus carpio*). *Aquaculture* **210**:245-257.
- RUANE, N.M., LAMBERT, J.G.D., GOOS, H.J.TH., KOMEN, J. (2005) Hypocorticism and interrenal hyperplasia are not directly related to masculinization in XX *mas*⁻¹/*mas*⁻¹ carp, *Cyprinus carpio*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **143**:66-74.
- RUBIO, V.C., SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, F.J., MADRID, J.A. (2004). Oral administration of melatonin reduces food intake and modifies macronutrient selection in European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *J. Pineal Res.* **37**:42-47.
- RUBIO, V.C., SÁNCHEZ, E., CERDÁ-REVERTER, J.M. (2010) Compensatory feeding in the sea bass after fasting and physical stress. *Aquaculture* **298**:332-337.
- SAITO, D., SHI, Q., ANDO, H., URANO, A. (2004) Attenuation of diurnal rhythms in plasma levels of melatonin and cortisol, and hypothalamic contents of vasotocin and isotocin mRNAs in pre-spawning chum salmon. *Gen. Comp. Endocrinol.* **137**:62-68.
- SAITO, S., TACHIBANA, T., CHOI, Y.-H., DENBOW, D.M., FURUSE, M. (2005) ICV melatonin reduces stress responses in neonatal chicks. *Behav. Brain Res.* **165**:197-203.
- SÁNCHEZ, J.A., SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, F.J. (2009) Feeding entrainment of daily rhythms of locomotor activity and clock gene expression in zebrafish brain. *Chronobiol. Int.* **26**:1120-1135.
- SÁNCHEZ, J.A., MADRID, J.A., SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, F.J. (2010) Molecular cloning, tissue distribution, and daily rhythms of expression of *per1* gene in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Chronobiol. Int.* **27**:19-33.
- SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, F.J., TABATA, M. (1998) Circadian rhythms of demand-feeding and locomotor activity in rainbow trout. *J. Fish Biol.* **52**:255-267.
- SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, F.J., MADRID, J.A. (2001) Feeding anticipatory activity. En: *Food intake in fish*. Houlihan, D., Boujard, T., Jobling, M. (Eds.). Blackwell Science Ltd., Oxford. pp. 216-232.
- SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, F.J., MADRID, J.A., ZAMORA, S., IIGO, M., TABATA, M. (1996) Demand feeding and locomotor circadian rhythms in the goldfish, *Carassius auratus*: dual and independent phasing. *Physiol. Behav.* **60**:665-674.
- SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, F.J., MADRID, J.A., ZAMORA, S., TABATA, M. (1997) Feeding entrainment of locomotor activity rhythms in the goldfish is mediated by a feeding-entrainable circadian oscillator. *J. Comp. Physiol. A* **181**:121-132.
- SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, F.J., YAMAMOTO, T., AKIYAMA, T., MADRID, J.A., TABATA, M. (1998) Selection of macronutrients by goldfish operating self-feeders. *Physiol. Behav.* **15**:211-218.

- SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, F.J., IIGO, M., MADRID, J.A., TABATA, M. (2000) Pinealectomy does not affect the entrainment to light nor the generation of the circadian demand-feeding rhythms of rainbow trout. *Physiol. Behav.* **69**:455-461.
- SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, F.J., ARANDA, A., MADRID, J.A. (2001) Differential effects of meal size and food energy density on feeding entrainment in goldfish. *J. Biol. Rhythm.* **16**:58-65.
- SAUZET, S., BESSEAU, L., HERRERA PÉREZ, P., COVÈS, D., CHATAIN, B., PEYRIC, E., BOEUF, G., MUÑOZ-CUETO, J.A., FALCÓN, J. (2008) Cloning and retinal expression of melatonin receptors in the European sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **157**:186-195.
- SCHADE, R., VICK, K., SOHR, R., OTT, T., PLISTER, C., BELLACK, J., MATTES, A., LEMMER, B. (1993) Correlative circadian rhythms of cholecystokinin and dopamine content in nucleus accumbens and striatum of rat brain. *Behav. Brain Res.* **59**:211-214.
- SCHIBLER, U., BROWN, S.A. (2005) Enlightening the adrenal gland. *Cell Metab.* **2**:278-281.
- SCHJOLDEN, J., PULMAN, K.G.T., POTTINGER, T.G., TOTTMAR, O., WINBERG, S. (2006) Serotonergic characteristics of rainbow trout divergent in stress responsiveness. *Physiol. Behav.* **87**:938-947.
- SCHULZ, C., PAULUS, K., LOBMANN, R., DALLMAN, M., LEHNERT, H. (2010) Endogenous ACTH, not only α -melanocyte-stimulating hormone, reduces food intake mediated by hypothalamic mechanisms. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **E 298**:237-244.
- SÉBERT, M.-E., LEGROS, C., WELTZIEN, F.-A., MALPAUX, B., CHEMINEAU, P., DUFOUR, S. (2008) Melatonin activates brain dopaminergic systems in the eel with an inhibitory impact on reproductive function. *J. Neuroendocrinol.* **20**:917-929.
- SELYE, H. (1950) Stress and the general adaptation syndrome. *Br. Med. J.* **1**:1383-1392.
- SELYE, H. (1974) Stress without distress. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia.
- SELYE, H. (1976) The stress of life. McGraw Hill, New York.
- SENTHILKUMARAN, B., JOY, K.P. (1995) Changes in hypothalamic catecholamines, dopamine-beta-hydroxylase, and phenylethanolamine-N-methyltransferase in the catfish *Heteropneustes fossilis* in relation to season, raised photoperiod and temperature, ovariectomy, and estradiol-17 beta replacement. *Gen. Comp. Endocrinol.* **97**:121-134.
- SERES, J., HERICHOVA, I. ROMAN, O., BORNSTEIN, S., JURCOVICOVA, J. (2004) Evidence for daily rhythms of the expression of proopiomelanocortin, interleukin-1-beta and interleukin-6 in adenopituitaries of male Long-Evans rats: effect of adjuvant arthritis. *Neuroimmunomodulat.* **11**:316-322.
- SEWER, M.B., WATERMAN, M.R. (2003) ACTH modulation of transcription factors responsible for steroid hydroxylase gene expression in the adrenal cortex. *Microsc. Res. Tech.* **61**:300-307.

- SEWER, M.B., DAMMER, E.B., JAGARLAPUDI, S. (2007) Transcriptional regulation of adrenocortical steroidogenic gene expression. *Drug Metab. Rev.* **39**:371-388.
- SHEARMAN, L.P., ZYLKA, M.J., REPERT, S.M., WEAVER, D.R. (1999) Expression of basic helix-loop-helix/PAS genes in the mouse suprachiasmatic nucleus. *Neuroscience* **89**:387-397.
- SHEARMAN, L.P., SRIRAM, S., WEAVER, D.R., MAYWOOD, E.S., CHAVES, I., ZHENG, B., KUME, K., LEE, C.C., VAN DER HORST, G.T., HASTINGS, M.H., REPERT, S.M. (2000) Interacting molecular loops in the mammalian circadian clock. *Science* **288**:1013-1019.
- SHERIDAN, M.A. (1994) Regulation of lipid metabolism in poikilothermic vertebrates. *Comp. Biochem. Phys. B* **107**:495-508.
- SHIEH, K.R., CHU, Y.S., PAN, J.T. (1997) Circadian change of dopaminergic neuron activity: effects of constant light and melatonin. *Neuroreport* **8**:2283-2287.
- SHIEH, K., YANG, S.-C., LU, X.-Y., AKIL, H., WATSON, S.J. (2005) Diurnal rhythmic expression of the rhythm-related genes, rPeriod1, rPeriod2, and rClock, in the rat brain. *J. Biomed. Sci.* **12**:209-217.
- SHIMAKURA, S.-I., MIURA, T., MARUYAMA, K., NAKAMACHI, T., UCHIYAMA, M., KAGEYAMA, H., SHIODA, S., TAKAHASHI, A., MATSUDA, K. (2008) α -Melanocyte-stimulating hormone mediates melanin-concentrating hormone-induced anorexigenic action in goldfish. *Horm. Behav.* **53**:323-328.
- SINGLEY, J.A., CHAVIN, W. (1975) Serum cortisol in normal goldfish (*Carassius auratus* L.). *Comp. Biochem. Phys. A* **50**:77-82.
- SINGLEY, J.A., CHAVIN, W. (1976) The diel rhythm of circulating ACTH titer in the goldfish (*Carassius auratus* L.). *Comp. Biochem. Phys. A* **53**:291-293.
- SINK, T.D., STRANGE, R.J., SAWYER, R.E. (2007) Clove oil used at lower concentrations is less effective than MS-222 at reducing cortisol stress responses in anesthetized rainbow trout. *N. Am. J. Fish. Manage.* **27**:156-161.
- SIRCAR, R. (2000) Effect of melatonin on cocaine-induced behavioral sensitization. *Brain Res.* **857**:295-299.
- SIUCIAK, J.A., GAMACHE, P.H., DUBOCOVICH, M. (1992) Monoamines and their precursors and metabolites in the chicken brain, pineal, and retina: regional distribution and day/night variations. *J. Neurochem.* **58**:722-729.
- SLOMINSKI, R.M., REITER, R.J., SCHLABRITZ-LOUTSEVITCH, N., OSTROM, R.S., SLOMINSKI, A.T. (2012) Melatonin membrane receptors in peripheral tissues: distribution and functions. *Mol. Cell. Endocrinol.* **351**:152-166.
- SLOTTEN, H.A., PITROSKY, B., PÉVET, P. (2000) Entrainment of rat circadian rhythms by melatonin does not depend on the serotonergic afferents to the suprachiasmatic nuclei. *Brain Res.* **876**:10-16.
- SMALL, B.C. (2005) Effect of fasting on nycthemeral concentrations of plasma growth hormone (GH), insulin-like growth factor I (IGF-I), and cortisol in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Comp. Biochem. Phys. B* **142**:217-223.

- SMITH, A.D., OLSON, R.J., JUSTICE, J.B. JR. (1992) Quantitative microdialysis of dopamine in the striatum: effect of circadian variation. *J. Neurosci. Methods* **44**:33-41.
- SMITH, V.M., STERNICZUK, R., PHILLIPS, C.I., ANTLE, M.C. (2008) Altered photic and non-photic phase shifts in 5-HT(1A) receptor knockout mice. *Neuroscience* **157**:513-523.
- SOENGAS, J.L., STRONG, E.F., ANDRÉS, M.D., ALDEGUNDE, M. (1998) Dose-dependent effects of acute melatonin treatments on brain carbohydrate metabolism of rainbow trout. *Fish Physiol. Biochem.* **18**:311-319.
- SOKAL, R.R., ROHLF, F.J. (1979) Biometría. Principios y métodos estadísticos en la investigación biológica. Ediciones Blume, Madrid.
- SON, G.H., CHENG, S., CHOE, H.K., KIM, H.D., BAIK, S.M., LEE, H., LEE, H.W., CHOI, S., SUN, W., KIM, H., CHO, S., LEWE, K.H., KIM, K. (2008) Adrenal peripheral clock controls the autonomous circadian rhythm of glucocorticoid by causing rhythmic steroid production. *PNAS* **105**:20970-20975.
- SON, G.H., CHUNG, S., KIM, K. (2011) The adrenal peripheral clock: glucocorticoid and the circadian timing system. *Front. Neuroendocrin.* **32**:451-465.
- SPIELER, R.E., NOESKE, T.A. (1984) Effects of photoperiod and feeding schedule on diel variations of locomotor activity, cortisol, and thyroxine in goldfish. *T. Am. Fish. Soc.* **113**:528-539.
- SPIGA, F., WAITE, E.J., LIU, Y., KERSHAW, Y.M., AGUILERA, G., LIGHTMAN, S.L. (2011) ACTH-dependent ultradian rhythm of corticosterone secretion. *Endocrinology* **152**:1448-1457.
- STOCCO, D.M. (2000) The role of the StAR protein in steroidogenesis: challenges for the future. *J. Endocrinol.* **164**:247-253.
- STOCCO, D.M. (2001) StAR protein and the regulation of steroid hormone biosynthesis. *Annu. Rev. Physiol.* **63**:193-213.
- STOCCO, D.M., WANG, X., JO, Y., MANNA, P.R. (2005) Multiple signaling pathways regulating steroidogenesis and steroidogenic acute regulatory protein expression: more complicated than we thought. *Mol. Endocrinol.* **19**:2647-2659
- STOLTE, E.H., DE MAZON, A.F., LEON-KOOSTERZIEL, K.M., JESIAK, M., BURY, N.R., STURM, A., SAVELKOUL, H.F.J., VAN KEMENADE, B., FLIK, G. (2008) Corticosteroid receptors involved in stress regulation in common carp, *Cyprinus carpio*. *J. Endocrinol.* **198**:403-417.
- STURM, A., BURY, N., DENGREVILLE, L., FAGART, J., FLOURIOT, G., RAFESTIN-OBLIN, M.E., PRUNET, P. (2005) 11-deoxycorticosterone is a potent agonist of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) mineralocorticoid receptor. *Endocrinology* **146**:47-55.
- SUMAYA, I.C., BYERS, D.M., IRWIN, L.N., DEL VAL, S., MOSS, D.E. (2004) Circadian-dependent effect of melatonin on dopaminergic D₂ antagonist-induced hypokinesia and agonist-induced stereotypies in rats. *Pharmacol. Biochem. Be.* **78**:727-733.

- TABATA, M., MINH-NYO, M., OGURI, M. (1988) Involvement of retinal and extraretinal photoreceptors in the mediation of nocturnal locomotor activity rhythms in the catfish, *Silurus asotus*. *Exp. Biol.* **47**:219-225.
- TAHARA, Y., OTSUKA, M., FUSE, Y., HIRAO, A., SHIBATA, S. (2011) Refeeding after fasting elicits insulin-dependent regulation of *Per2* and *Rev-erba* with shifts in the liver clock. *J. Biol. Rhythms* **6**:230-240.
- TAKAHASHI, A., KOBAYASHI, Y., AMANO, M., YAMANOME, T. (2009) Structural and functional diversity of proopiomelanocortin in fish with special reference to barfin flounder. *Peptides* **30**:1374-1382.
- TAKEMURA, A., UCHIMURA, M., SHIBATA, Y. (2010) Dopaminergic activity in the brain of a tropical wrasse in response to changes in light and hydrostatic pressure. *Gen. Comp. Endocrinol.* **166**:513-519.
- TAMARKIN, L., WESTROM, W.K., HAMILL, A.I., GOLDMAN, B.D. (1976) Effect of melatonin on the reproductive systems of male and female Syrian hamsters: a diurnal rhythm in sensitivity to melatonin. *Endocrinology* **99**:1534-1541.
- TANAKA, D., FURUSAWA, K., KAMEYAMA, K., OKAMOTO, H., DOI, M. (2007) Melatonin signaling regulates locomotion behavior and homeostatic states through distinct receptor pathways in *Caenorhabditis elegans*. *Neuropharmacology* **53**:157-168.
- TASKER, J.G., DI, S., MALCHER-LOPES, R. (2006) Rapid glucocorticoid signalling via membrane-associated receptors. *Endocrinology* **147**:5549-5556.
- TAYLOR, J.F., MIGAUD, H., PORTER, M.J.R., BROMAGE, N.R. (2005) Photoperiod influences growth rate and plasma insulin-like growth factor-I levels in juvenile rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **142**:169-187.
- TEITSMA, C.A., ANGLADE, I., TOUTIRAIS, G., MUÑOZ-CUETO, J.A., SALIGAUT, D., DUCOURET, B., KAH, O. (1998) Immunohistochemical localization of glucocorticoid receptors in the forebrain of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Comp. Neurol.* **401**:395-410.
- TENN, C.C., NILES, L.P. (1997) Mechanisms underlying the antidopaminergic effect of clonazepam and melatonin in striatum. *Neuropharmacology* **36**:1659-1663.
- THORPE, J.E., McCONWAY, M.G., MILES, M.S., MUIR, J.S. (1987) Diel and seasonal changes in resting plasma cortisol levels in juvenile Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Gen. Comp. Endocrinol.* **65**:19-22.
- TORRES-FARFÁN, C., RICHTER, H.G., ROJAS-GARCÍA, P., VERGARA, M., FORCELLEDO, M.L., VALLADARES, L.E., TORREALBA, F., VALENZUELA, G.J., SERÓN-FERRÉ, M. (2003a) mt1 melatonin receptor in the primate adrenal gland: inhibition of adrenocorticotropin-stimulated cortisol production by melatonin. *J. Clin. Endocr. Metab.* **88**:450-458.
- TORRES-FARFÁN, C., RICHTER, H.G., GERMAIN, A.M., VALENZUELA, G.J., CAMPINO, C., ROJAS-GARCÍA, P., FORCELLEDO, M.L., TORREALBA, F., SERÓN-FERRÉ, M. (2003b) Maternal melatonin selectively inhibits cortisol production in the primate fetal adrenal gland. *J. Physiol.* **554**:841-856.
- TORRES-FARFÁN, C., SERÓN-FERRÉ, M., DINET, V., KORF, H.W. (2006) Immunocytochemical demonstration of day/night changes of clock gene protein

- levels in the murine adrenal gland: differences between melatonin-proficient (C3H) and melatonin-deficient (C57BL) mice. *J. Pineal Res.* **40**:64-70.
- TORRES-FARFÁN, C., VALENZUELA, F.J., EBENSPERGER, R., MÉNDEZ, N., CAMPINO, C., RICHTER, H.G., VALENZUELA, G.J., SERÓN-FERRÉ, M. (2008) Circadian cortisol secretion and circadian adrenal responses to ACTH are maintained in dexamethasone suppressed capuchin monkeys (*Cebus apella*). *Am. J. Primatol.* **73**:93-100.
 - TORRES-FARFÁN, C., ABARZUA-CATALÁN, L., VALENZUELA, F.J., MÉNDEZ, N., RICHTER, H.G., VALENZUELA, G.J., SERÓN-FERRÉ, M. (2009) Cryptochrome 2 expression level is critical for adrenocorticotropin stimulation of cortisol production in the capuchin monkey adrenal. *Endocrinology* **150**:2717-2722.
 - TOSINI, G., DIRDEN, J.C. (2000) Dopamine inhibits melatonin release in the mammalian retina: *in vitro* evidence. *Neurosci. Lett.* **286**:119-122.
 - TOUITOU, Y., BOGDAN, A., AUZÉBY, A., TOUITOU, C. (1989) Activity of melatonin and other pineal indoles on the *in vitro* synthesis of cortisol, cortisone, and adrenal androgens. *J. Pineal Res.* **6**:341-350.
 - TRESGUERRES, J.A.F. (2002) Integración y adaptación del organismo: estrés. En: *Fisiología humana*. Interamericana McGraw Hill. pp. 1147-1154.
 - TSUTSUI, K., INOUE, K., MIYABARA, H., SUZUKI, S., OGURA, Y., HARAGUCHI, S. (2008) 7 α -hydroxypregnenolone mediates melatonin action underlying diurnal locomotor rhythms. *J. Neurosci.* **28**:2158-2167.
 - UEDA, S., SAKAKIBARA, S., KADOWAKI, T., NAITOH, T., HIRATA, K., YOSHIMOTO, K. (2008) Chronic treatment with melatonin attenuates serotonergic degeneration in the striatum and olfactory tubercle of zitter mutant rats. *Neurosci. Lett.* **448**:212-216.
 - ULRICH-LAI, Y.M., ARNHOLD, M.M., ENGELAND, W.C. (2006) Adrenal splachnic innervation contributes to the diurnal rhythm of plasma corticosterone in rats by modulating adrenal sensitivity to ACTH. *Am. J. Physiol.-Reg. I.* **290**:1128-1135.
 - UNDERWOOD, H., HARLESS, M. (1985) Entrainment of the circadian activity rhythm of a lizard to melatonin injections. *Physiol. Behav.* **35**:267-270.
 - UZ, T., AKHISAROGLU, M., AHMED, R., MANEV, H. (2003) The pineal gland is critical for circadian period1 expression in the striatum and for circadian cocaine sensitization in mice. *Neuropsychopharmacol.* **28**:2117-2123.
 - UZ, T., ARSLAN, A.D., KURTUNCU, M., IMBESI, M., AKHISAROGLU, M., DWIVEDI, Y., PANDEY, G.N., MANEV, H. (2005) The regional and cellular expression profile of the melatonin receptor MT1 in the central dopaminergic system. *Mol. Brain Res.* **136**:45-53.
 - VALENZUELA, F.J., TORRES-FARFÁN, C., RICHTER, H.G., MÉNDEZ, N., CAMPINO, C., TORREALBA, F., VALENZUELA, G.J., SERÓN-FERRÉ, M. (2008) Clock gene expression in adult primate suprachiasmatic nuclei and adrenal: is the adrenal a peripheral clock responsive to melatonin? *Endocrinology* **149**:1454-1461.
 - VAN DEN BURG, E.H., METZ, J.R., SPANINGS, F.A.T., WENDELAAR BONGA, S.E., FLIK, G. (2005) Plasma α -MSH and acetylated β -endorphin levels following stress

vary according to CRH sensitivity of the pituitary melanotropes in common carp, *Cyprinus carpio*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **140**:210-221.

- VAN DER SALM, A.L., PAVLIDIS, M., FLIK, G., WENDELAAR BONGA, S.E. (2006) The acute stress response of red porgy, *Pagrus pagrus*, kept on a red or white background. *Gen. Comp. Endocrinol.* **145**:247-253.
- VAN REETH, O., OLIVARES, E., ZHANG, Y., ZEE, P.C., MOCAER, E., DEFRANCE, R., TUREK, F.W. (1997) Comparative effects of a melatonin agonist on the circadian system in mice and Syrian hamsters. *Brain Res.* **762**:185-194.
- VATINE, G., VALLONE, D., APPELBAUM, L., MRACEK, P., BEN-MOSHE, Z., LAHIRI, K., GOTHILF, Y., FOULKES, N.S. (2009) Light directs zebrafish *period2* expression via conserved D and E Boxes. *PLoS Biol.* **7**:e1000223.
- VATINE, G., VALLONE, D., GOTHILF, Y., FOULKES, N.S. (2011). It's time to swim! Zebrafish and the circadian clock. *FEBS Lett.* **585**:1485-1494.
- VAUGHAN, M.K., VAUGHAN, G.M., REITER, R.J., BENSON, B. (1972) Effect of melatonin and other pineal indoles on adrenal enlargement produced in male and female mice by pinealectomy, unilateral adrenalectomy, castration, and cold stress. *Neuroendocrinology* **10**:139-154.
- VELARDE, E., HAQUE, R., IUVONE, P.M., AZPELETA, C., ALONSO-GÓMEZ, A.L., DELGADO, M.J. (2009a) Circadian clock genes of goldfish, *Carassius auratus*: cDNA cloning and rhythmic expression of period and cryptochrome transcripts in retina, liver, and gut. *J. Biol. Rhythms* **24**:104-113.
- VELARDE, E., ALONSO-GÓMEZ, A.L., AZPELETA, C., ISORNA, E., DELGADO, M.J. (2009b) Melatonin attenuates the acetylcholine-induced contraction in isolated intestine of a teleost fish. *J. Comp. Physiol. B* **179**:951-959.
- VELARDE, E., CERDÁ-REVERTER, J.M., ALONSO-GÓMEZ, A.L., SÁNCHEZ, E., ISORNA, E., DELGADO, M.J. (2010) Melatonin-synthesizing enzymes in pineal, retina, liver, and gut of the goldfish (*Carassius auratus*): mRNA expression pattern and regulation of daily rhythms by lighting conditions. *Chronobiol. Int.* **27**:1178-1201.
- VELARDE, E., ISORNA, E., DELGADO, M.J. (2011) The molecular clock of goldfish retina: cloning and daily expression of *bmal1*, *npas2* and *clock*. En: *Avances en endocrinología comparada*. Vol. VI. Delgado, M.J., Alonso-Gómez, A.L., De Pedro, N., Isorna, E. (Eds.). Servicio de Publicaciones Universidad Complutense de Madrid. pp. 180-182.
- VEO, K., REINICK, C., LIANG, L., MOSER, E., ANGLESON, J.K., DORES, R.M. (2011) Observations on the ligand selectivity of the melanocortin 2 receptor. *Gen. Comp. Endocrinol.* **172**:3-9.
- VERA, L.M., DE PEDRO, N., GÓMEZ-MILÁN, E., DELGADO, M.J., SÁNCHEZ-MUROS, M.J., MADRID, J.A., SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, F.J. (2007) Feeding entrainment of locomotor activity rhythms, digestive enzymes and neuroendocrine factors in goldfish. *Physiol. Behav.* **90**:518-524.

- VIJAYAN, M.M., PEREIRA, C., GRAU, E.G., IWAMA, G.K. (1997) Metabolic responses associated with confinement stress in tilapia: the role of cortisol. *Comp. Biochem. Phys. C* **116**:89-95.
- VIRDEN, W.S., THAXTON, J.P., CORZO, A., DOZIER III, W.A., KIDD, M.T. (2007) Evaluation of models using corticosterone and adrenocorticotropin to induce conditions mimicking physiological stress in commercial broilers. *Poultry Sci.* **86**:2485-2491.
- VIVAS, Y. (2009) Efectos de la leptina en la regulación de la ingestión de alimento y la actividad locomotora en el carpín: dependencia circadiana e interacción con la β -endorfina. Tesis de Licenciatura. Universidad Complutense de Madrid.
- VIVAS, Y., AZPELETA, C., FELICIANO, A., VELARDE, E., ISORNA, E., DELGADO, M.J., DE PEDRO, N. (2011) Time-dependent effects of leptin on food intake and locomotor activity in goldfish. *Peptides* **32**:989-995.
- VOLKOFF, H., CANOSA, L.F., UNNIAPPAN, S., CERDÁ-REVERTER, J.M., BERNIER, N.J., KELLY, S.P., PETER, R.E. (2005) Neuropeptides and the control of food intake in fish. *Gen. Comp. Endocrinol.* **142**:3-19.
- VOLKOFF, H., UNNIAPPAN, S., KELLY, S.P. (2009) The endocrine regulation of food intake. En: *Fish Neuroendocrinology*. Bernier, N.J., van der Kraak, G., Farrell, A.P., Brauner, C.J. (Eds.). *Fish Physiol.* **28**:421-465.
- VON GALL, C., GARABETTE, M.L., KELL, C.A., FRENZEL, S., DEHGHANI, F., SCHUMM-DRAEGER, P.-M., WEAVER, D.R., KORF, H.-W., HASTINGS, M.H., STEHLE, J.H. (2002) Rhythmic gene expression in pituitary depends on heterologous sensitization by the neurohormone melatonin. *Nat. Neurosci.* **5**:234-238.
- VON GALL, C., WEAVER, D.R., MOEK, J., JILG, A., STEHLE, J.H., KORF, H.-W. (2005) Melatonin plays a crucial role in the regulation of rhythmic clock gene expression in the mouse *pars tuberalis*. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1040**:508-511.
- WALKER, J.J., FERRY, J.R., LIGHTMAN, S.L. (2010) Origin of ultradian pulsatility in the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *P. R. Soc. B.* **277**:1627-1633.
- WARING, C.P., STAGG, R.M., POXTON, M.G. (1996) Physiological responses to handling in the turbot. *J. Fish Biol.* **48**:161-173.
- WATTS, A.G. (2005) Glucocorticoid regulation of peptide genes in neuroendocrine CRH neurons: a complexity beyond negative feedback. *Front. Neuroendocrin.* **26**:109-130.
- WATTS, A.G., SWANSON, L.W. (1989) Diurnal variations in the content of prepro corticotropin-releasing hormone messenger ribonucleic acids in the hypothalamic paraventricular nucleus of rats of both sexes as measured by *in situ* hybridization. *Endocrinology* **125**:1734-1738.
- WATTS, A.G., TANIMURA, S., SÁNCHEZ-WATTS, G. (2004) Corticotropin-releasing hormone and arginine vasopressin gene transcription in the hypothalamic paraventricular nucleus of unstressed rats: daily rhythms and their interactions with corticosterone. *Endocrinology* **145**:529-540.
- WEISER, M.J., OSTERLUND, C., SPENCER, R.L. (2011) Inhibitory effects of corticosterone in the hypothalamic paraventricular nucleus (PVN) on stress-induced

- adrenocorticotrophic hormone secretion and gene expression in the PVN and anterior pituitary. *J. Neuroendocrinol.* **23**:1231-1240.
- WENDELAAR BONGA, S.E. (1997) The stress response in fish. *Physiol. Rev.* **77**:591-625.
 - WHITMORE, D., FOULKES, N.S., STRAHLE, U., SASSONE-CORSI, P. (1998) Zebrafish clock rhythmic expression reveals independent peripheral circadian oscillators. *Nat. Neurosci.* **1**:701-707.
 - WILKINSON, C.W. (2008) Circadian clocks: showtime for the adrenal cortex. *Endocrinology* **149**:1451-1453.
 - WILLIAMS, J.A. (2004) Molecular analysis of circadian rhythms: nonmammalian vertebrates. En: *Molecular biology of circadian rhythms*. Sehgal, A. (Ed.). Hoboken, NJ: John Wiley & Sons. pp. 75-92.
 - WINBERG, S., NILSSON, G.E. (1993) Roles of brain monoamine transmitters in agonistic behaviour and stress reactions, with particular reference to fish. *Comp. Biochem. Phys. C* **106**:597-614.
 - WINBERG, S., LEPAGE, O. (1998) Elevation of brain 5-HT activity, POMC expression, and plasma cortisol in socially subordinate rainbow trout. *Am. J. Physiol.-Reg. I.* **274**:645-654.
 - WINBERG, S., NILSSON, A., HYLLAND, P., SÖDERSTÖM, V., NILSSON, G.E. (1997) Serotonin as a regulator of hypothalamic-pituitary-interrenal activity in teleost fish. *Neurosci. Lett.* **230**:113-116.
 - WONG, M.L., MEDRANO, J.F. (2005) Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques* **39**:1-11.
 - WONG, M.M.L., YU, R.M.K., NG, P.K.S., LAW, S.H.W., TSANG, A.K.C., KONG, R.Y.C. (2007) Characterization of a hypoxia-responsive leptin receptor (omLepRL) cDNA from the marine medaka (*Oryzias melastigma*). *Mar. Pollut. Bull.* **54**:797-803.
 - WU, C.-S., LEU, S.-F., YANG, H.-Y., HUANG, B. (2001) Melatonin inhibits the expression of Steroidogenic Acute Regulatory protein and steroidogenesis in MA-10 cells. *J. Androl.* **22**:245-254.
 - WU, Y.-H., ZHOU, J.N., BALESAR, R., UNMEHOPA, U., BAO, A., JOCKERS, R., VAN HEERIKHUIZE, J., SWAAB, D.F. (2006) Distribution of mt1 melatonin receptor immunoreactivity in the human hypothalamus and pituitary gland: colocalization of mt1 with vasopressin, oxytocin, and corticotropin-releasing hormone. *J. Comp. Neurol.* **499**:897-910.
 - WULLIMANN, M.F., RINK, E. (2002) The teleostean forebrain: a comparative and developmental view based on early proliferation, *Pax6* activity and catecholaminergic organization. *Brain Res. Bull.* **57**:363-370.
 - WYSOCKI, L.E., DITTAMI, J.P., LADICH, F. (2006) Ship noise and cortisol secretion in European freshwater fishes. *Biol. Conserv.* **128**:501-508.
 - YADU, Y., SHEDPURE, M. (2002a) Pinealectomy does not modulate the characteristics of 24-h variation in air-gulping activity of *Clarias batrachus*. *Biol. Rhythm Res.* **33**:141-150.

- YADU, Y., SHEDPURE, M. (2002b) Effect of pinealectomy on re-entrainment of air-gulping activity in Indian walking catfish, *Clarias batrachus*. *Biol. Rhythm Res.* **33**:463-473.
- YAMANO, H., WATARI, Y., ARAI, T., TAKEDA, M. (2001) Melatonin in drinking water influences a circadian rhythm of locomotor activity in the house cricket, *Acheta domesticus*. *J. Insect Physiol.* **47**:943-949.
- YASUO, S., YOSHIMURA, T., BARTELL, P.A., IIGO, M., MAKINO, E., OKABAYASHI, N., EBIHARA, S. (2002) Effect of melatonin administration on qPer2, qPer3, and qClock gene expression in the suprachiasmatic nucleus of Japanese quail. *Eur. J. Neurosci.* **16**:1541-1546.
- YOSHIOKA, K., XIE, F., GITZEN, J.F., KISSINGER, C.B., KISSINGER, P.T. (2000) Preliminary study of the effects of AMT administration on the release of endogenous 5-HT and its metabolite in the rat SCN. *Curr. Separations* **4**:117-122.
- ZHDANOVA, I.V. (2001) Melatonin promotes sleep-like state in zebrafish. *Brain Res.* **903**:263-268.
- ZHDANOVA, I.V. (2005) Melatonin as a hypnotic: Pro. *Sleep Med. Rev.* **9**:51-65.
- ZHDANOVA, I.V., WURTMAN, N.J., MORABITO, C., PIOTROVSKA, V.R., LYNCH, H.J. (1996) Effects of low oral doses of melatonin, given 2-4 hours before habitual bedtime, on sleep in normal young humans. *Sleep* **19**:423-431.
- ZHDANOVA, I.V., CANTOR, M.L., LECLAIR, O.U., KARTASHOV, A.I., WURTMAN, R.J. (1998) Behavioral effects of melatonin treatment in non-human primates. *Sleep Res. Online* **1**:114-118.
- ZHDANOVA, I.V., GEIGER, D.A., SCHWAGERL, A.L., LECLAIR, O.U., KILLIANY, R., TAYLOR, J.A., ROSENE, D.L., MOSS, M.B., MADRAS, B.K. (2002) Melatonin promotes sleep in three species of diurnal nonhuman primates. *Physiol. Behav.* **75**:523-529.
- ZHDANOVA, I.V., YU, L., LÓPEZ-PATIÑO, M., SHANG, E., KISHI, S., GUELIN, E. (2008) Aging of the circadian system in zebrafish and the effects of melatonin on sleep and cognitive performance. *Brain Res. Bull.* **75**:433-441.
- ZISAPEL, N. (2002) Melatonin-dopamine interactions: from basic neurochemistry to a clinical setting. *Cell. Mol. Neurobiol.* **21**:605-616.

VII. RESUMEN GENERAL

GENERAL SUMMARY

INTRODUCCIÓN

La reducción del inherente impacto que conlleva el manejo de los peces es uno de los principales retos a los que se enfrenta la acuicultura actual. Las respuestas fisiológicas a la exposición a estos procedimientos implican una activación del eje hipotálamo-hipófisis-interrenal (HPI), que estimula la liberación del factor liberador de corticotropina (CRF) hipotalámico, cuya unión a receptores específicos (CRF-R1) en la hipófisis constituye una señal clave en el procesamiento de la proopiomelanocortina (POMC) y la producción de adrenocorticotropina (ACTH). Ésta se une a receptores específicos (MC2R) en las células esteroideogénicas del tejido interrenal, lo que activa a la proteína StAR y facilita la entrada de colesterol al interior de la mitocondria, donde será transformado enzimáticamente para finalmente producir cortisol, que en último término será liberado a la circulación general (Bentley, 2002).

La melatonina (MEL) es una neurohormona sintetizada principalmente en la glándula pineal y la retina de prácticamente todos los vertebrados estudiados, cuya producción presenta oscilaciones diarias, con niveles circulantes mayores durante la noche que durante el periodo de luz, tanto en animales con un cronotipo diurno como en animales nocturnos (Reiter, 1991). La MEL es una molécula clave del sistema circadiano de los vertebrados y desempeña, en general, un papel sincronizador de numerosas funciones rítmicas con los cambios cíclicos ambientales (Arendt y Skene, 2005). En los últimos años, se ha propuesto para la MEL una posible función moduladora de las respuestas al estrés en varios grupos de vertebrados (Rao *et al.*, 2001; Saito *et al.*, 2005), siendo muy escasos los estudios realizados sobre este aspecto en los peces.

El sistema circadiano de los peces es multioscilar, y está formado por una red de relojes acoplados que funcionan de manera independiente, aunque se intercomunican entre sí (Falcón *et al.*, 2007). Cada uno de estos relojes se autorregula mediante bucles de retroalimentación positiva y negativa, que dirigen la transcripción y traducción de los denominados genes reloj (*per* y *cry* pertenecientes al bucle negativo, *bmal1* y *clock* al bucle positivo), con un periodo aproximado de 24 h (Nader *et al.*, 2010).

La presente Tesis Doctoral tiene por objetivo general el estudio de aspectos funcionales del eje HPI de teleósteos y su relevancia como posible diana de los efectos de la MEL, utilizando como modelos experimentales el carpín (*Carassius auratus*) y la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*). Para ello, se desarrollan los siguientes objetivos concretos: 1. Investigar la existencia de oscilador(es) circadianos en el eje HPI mediante el estudio de la expresión de genes reloj y de genes

funcionales del eje a lo largo de un ciclo completo de 24 h. 2. Profundizar en el estudio del efecto relajante de la MEL tanto en condiciones basales como en situaciones de exposición a estrés, investigando el efecto de la hormona sobre parámetros circulantes (cortisol, glucosa y lactato), comportamentales (ingesta y actividad locomotora) y genéticos (expresión de genes funcionales del eje HPI). 3. Analizar la existencia de posibles dianas de la MEL en el propio eje HPI. 4. Estudiar el posible papel de la hormona en la sincronización de la actividad locomotora, la expresión de genes reloj y el contenido de monoaminas encefálicas en ausencia de los *zeitgebers* ciclo luz/oscuridad y horario de alimentación.

CONTENIDO DE LA INVESTIGACIÓN

1. Ritmicidad diaria del eje HPI en el carpín.

Con el fin de investigar la posible ritmicidad circadiana del eje HPI del carpín, nos planteamos examinar la expresión diaria de algunos genes funcionales relacionados con la actividad de dicho eje, así como la expresión de genes reloj. Para ello, los carpines se aclimatan durante 4 semanas a condiciones de fotoperiodo 12L:12D (encendido de las luces a las 7:30 h) y alimentación diaria a las 10:30 h, registrando de forma ininterrumpida la actividad locomotora. El muestreo del hipotálamo, la hipófisis y el tejido interrenal se realiza en intervalos de 3 h durante un ciclo completo de 24 h, para cuantificar la expresión de genes funcionales del eje HPI (*precursor de crf* en el hipotálamo, *crf-r1* y *pomc* en la hipófisis, y *mc2r* y *star* en el tejido interrenal) y de genes reloj (*per1a*, *per2a*, *per3*, *cry1a*, *cry2a*, *cry3*, *bmal1a*, *clock1a* y “*clock2-like*”, en los tres tejidos).

Los carpines muestran un ritmo de actividad con una periodicidad de 24 h, con valores significativamente mayores durante la fotofase y una marcada actividad anticipatoria al alimento, lo que demuestra la sincronización a los *zeitgebers* ciclo luz/oscuridad y horario de alimentación. En relación a los genes funcionales del eje HPI, únicamente *crf-r1* muestra un ritmo de expresión diaria significativa, lo que sugiere que la posible ritmicidad circadiana del eje HPI no dependería de la expresión rítmica de los genes analizados, si bien no se puede descartar una regulación a otros niveles post-transcripcionales. Por otra parte, la expresión de todos los genes reloj analizados muestra ritmos diarios significativos en los tres niveles del eje HPI (excepto *per2a*, que solo se expresa rítmicamente en el hipotálamo, y *cry1a*, que no muestra oscilaciones en el tejido interrenal), siendo los perfiles temporales de expresión de cada gen muy similares en todos los tejidos: los ritmos de *per1a*, *per3*, *cry1a* y *cry3* muestran sus acrofases en la interfase oscuridad/luz, en antifase con los ritmos de

bmal1a, *clock1a* y “*clock2-like*”, con acrofases en la interfase luz/oscuridad, coincidiendo con los descritos en otros estudios en peces, independientemente de su cronotipo, y en estudios similares en mamíferos (Cahill, 2002; Girotti *et al.*, 2009). La acrofase de los ritmos de *per1a* y *cry3* es inmediatamente anterior al inicio del periodo de luz, lo que sugiere una anticipación a la fotofase y/o la llegada de alimento. La acrofase de *per3* aparece inmediatamente antes de la hora de alimentación, sugiriendo que esta podría ser el principal sincronizador que dirige sus ritmos de expresión. El gen *cry1a* muestra su expresión máxima al inicio de la fotofase en el hipotálamo y la hipófisis, indicando que la luz puede resultar un sincronizador más potente que el horario de alimentación para este gen en tejidos centrales. El ritmo de *per2a* en el hipotálamo muestra su acrofase en mitad del periodo de luz, apoyando que es un gen inducible por la luz en osciladores fotosensibles. Respecto a los genes del bucle positivo, sus perfiles rítmicos de expresión están muy conservados en los teleósteos, pero muestran marcadas diferencias en relación a los datos de mamíferos y *Drosophila* (Shearman *et al.*, 2000; Williams, 2004), lo que sugiere diferentes mecanismos reguladores y/o funciones de estos genes reloj a lo largo de la filogenia.

2. Tratamientos con MEL y eje HPI.

Con el fin de profundizar en el efecto relajante de la MEL en el carpín, esta se administra utilizando dos vías, intraperitoneal (IP, periférica) e intracerebroventricular (ICV, central), durante 7 y 4 días, respectivamente. La MEL administrada IP, pero no ICV, reduce significativamente los niveles de cortisol plasmático y la actividad locomotora (incluyendo las actividades diurna, nocturna y anticipatoria al alimento), lo que apunta a un papel periférico de esta hormona en la regulación de ambos parámetros. Por otra parte, el efecto relajante de la MEL sobre la actividad locomotora no parece ser una consecuencia directa de su acción anorexigénica, ya que 10 días de restricción alimentaria (50% de la ración habitual de alimento) no modifican significativamente ni la actividad locomotora diaria ni los niveles plasmáticos de cortisol en el carpín.

A continuación, se estudian los posibles efectos de la administración IP de MEL (2 y 20 µg/g) en las respuestas a un modelo de estrés agudo (1 min de exposición al aire) en el carpín. La exposición al estrés incrementa el cortisol circulante y reduce la ingesta, sin producir modificaciones significativas ni en la glucemia ni en la actividad locomotora. La administración de MEL revierte ambos efectos a las 2 h de la inyección, observándose además una reducción de la actividad locomotora a las 2,5 y 24 h posteriores, lo que señala a la MEL como posible hormona anti-estrés en el carpín.

Para averiguar si estos efectos de la MEL pueden realizarse a través del eje HPI, se analizan los posibles cambios en la expresión de algunos genes funcionales del mismo: *precursor de crf* en el hipotálamo, *crf-r1* y *pomc* en la hipófisis, y *mc2r* y *star* en el riñón. La administración de MEL (20 µg/g) durante 4 días revierte el incremento en la expresión de *star* inducido por la exposición a un protocolo de estrés agudo (5 min de manipulación), sugiriendo que el tejido interrenal puede ser una posible diana para la acción anti-estrés de esta hormona.

3. Posibles dianas de la MEL en el eje HPI.

Para profundizar en el estudio de las posibles dianas en el eje HPI sobre las que la MEL ejerce su efecto reductor del cortisol plasmático, en primer lugar se realiza un experimento preliminar de activación del eje mediante la administración exógena de ACTH (50 y 200 ng/g). Esta desencadena una respuesta primaria al estrés, con un incremento significativo en los niveles plasmáticos de cortisol, sin afectar a otros metabolitos circulantes (glucosa y lactato) ni a parámetros comportamentales (ingesta y actividad locomotora). A partir de estos resultados, diseñamos el experimento posterior, con el que se pretende determinar si la inyección IP de MEL (20 µg/g) es capaz de contrarrestar la estimulación del eje HPI inducida por CRF (1 µg/µl, inyección ICV) o ACTH (50 ng/g, inyección IP). La administración de cualquiera de los dos péptidos induce una estimulación esperable del eje HPI, con un incremento significativo en los niveles de cortisol circulante a las 2 h de las inyecciones. Sin embargo, este efecto no es revertido por el tratamiento con MEL, lo que sugiere que una activación suprafisiológica del eje HPI como la generada en nuestro diseño experimental, podría enmascarar el efecto de la MEL reduciendo el cortisol circulante.

Con el fin de investigar si la reducción del cortisol inducida por la MEL se ejerce de forma directa a nivel interrenal, se realizan ensayos *in vitro* con dicho tejido, comparando la respuesta en dos especies de teleósteos: el carpín y la trucha arco iris. El tejido interrenal del carpín se cultiva en dos sistemas, en superfusión y estático, analizando el efecto de la MEL (1-100 nM), con o sin luzindol (antagonista general de los receptores de MEL, 1 µM), sobre el tejido estimulado con ACTH (50 nM). El tejido interrenal de la trucha se cultiva en un sistema estático y se estimula con ACTH (1,3 µM) en presencia de MEL (0,1-10 nM), con o sin luzindol (1 µM). En el carpín, la MEL (1-100 nM) reduce la cantidad total y el máximo nivel de cortisol liberado por el tejido interrenal estimulado con ACTH, sin modificar la liberación basal, y permite una recuperación más rápida de los niveles basales de cortisol tras la estimulación. Estos efectos de la MEL parecen estar mediados por receptores melatoninérgicos específicos, ya que se revierten, al menos en parte, con el pre-tratamiento con

luzindol. En la trucha arco iris, los resultados son muy similares a los encontrados en el carpín, con una reducción de la liberación de cortisol estimulada por ACTH tras la adición de MEL (0,1-10 nM) y una reversión significativa de este efecto tras la pre-incubación con luzindol. En la actualidad desconocemos el mecanismo subyacente a este efecto directo de la MEL en el tejido interrenal de los peces, si bien estudios *in vitro* en mamíferos proponen una acción inhibidora de las enzimas implicadas en la esteroidogénesis adrenal, mediada por receptores MT1 (Torres-Farfán *et al.*, 2003).

4. La MEL como sincronizador en el carpín.

Finalmente, se investiga el posible efecto de un tratamiento crónico con MEL en la sincronización de los ritmos de actividad locomotora diaria, expresión de genes reloj y contenido de monoaminas encefálicas en el carpín en ausencia de los *zeitgebers* ciclo luz/oscuridad y horario de alimentación. Para ello, se realiza un primer diseño experimental en el que los carpines se aclimatan a un fotoperiodo 12L:12D (encendido de las luces a las 7:00 h) y se alimentan diariamente a las 10:00 h durante 14 días. Posteriormente, se aplican condiciones de luz constante y horario de alimentación aleatorio (ausencia de *zeitgebers*), y 8 días después los peces se inyectan IP con MEL (1 µg/g) a las 9:00 h (CT2) o a las 21:00 h (CT14) durante 8 días (inyectando salino a los respectivos controles), incrementando la dosis a 5 µg/g durante los 7 días posteriores. Seguidamente, el protocolo de inyecciones se revierte, de forma que los peces tratados con salino se inyectan con MEL y viceversa. Tras 11 días, se suspenden las inyecciones, manteniendo las condiciones de luz constante y alimentación aleatoria, para finalmente retornar a las condiciones iniciales de fotoperiodo 12L:12D y alimentación diaria a las 10:00 h durante 7 días. La actividad locomotora se registra a lo largo de todo el experimento. Los carpines mantenidos en condiciones 12L:12D y alimentación diaria en horario fijo muestran un claro patrón diurno de actividad locomotora con una periodicidad circadiana ($\tau = 24,0$ h) que se pierde en ausencia de ambos *zeitgebers*. El tratamiento con MEL sincroniza de forma dosis-dependiente la actividad locomotora, restaurando un ritmo similar al observado en presencia de los *zeitgebers*, pero únicamente cuando se inyecta a las 21:00 h (y no a las 9:00 h). Este efecto sincronizador se mantiene hasta 7 días después de la retirada de la hormona exógena, y desaparece de forma progresiva, lo que no apoya un hipotético efecto de enmascaramiento de las inyecciones.

Posteriormente, se repite el experimento anterior hasta la fase de inyecciones de MEL (5 µg/g), administrando la hormona únicamente a las 21:00 h. Tras este periodo, se muestrean el telencéfalo y el techo óptico en intervalos de 6 h durante un ciclo completo de 24 h para analizar la expresión de genes reloj (*per1*, *per2*, *per3* y *cry3*) y

cuantificar el contenido de monoaminas (adrenalina, noradrenalina, dopamina, L-DOPA, DOPAC, serotonina y 5-HIAA). La administración crónica de MEL IP sincroniza la expresión de *per1a* y *per3* en telencéfalo y techo óptico, y de *cry3* en el telencéfalo, lo que coincide con resultados en mamíferos (Von Gall *et al.*, 2002), y sugiere que la hormona podría estar actuando en la maquinaria molecular de los osciladores para generar ritmos de genes reloj que finalmente dirigirían la sincronización de la actividad locomotora. Respecto a las monoaminas, los carpines tratados con MEL muestran un ritmo en la tasa de recambio de dopamina en el telencéfalo y en el contenido de dopamina y serotonina en el techo óptico, si bien nuestros resultados no permiten concluir que la sincronización de la actividad locomotora por MEL esté mediada por una modulación del contenido de monoaminas encefálicas.

CONCLUSIONES

A partir de estos resultados proponemos las siguientes conclusiones:

1. Por primera vez en peces, se propone la existencia de osciladores funcionales en el hipotálamo, la hipófisis y el tejido interrenal, que constituirían posibles nodos en la red multioscilar del sistema circadiano del carpín. Estos osciladores no parecen dirigir la transcripción rítmica de ciertos genes funcionales del eje HPI, si bien no podemos descartar posibles regulaciones alternativas a niveles post-transcripcionales.
2. La melatonina ejerce un efecto relajante a nivel periférico en el carpín, reduciendo la actividad locomotora y revirtiendo el incremento de cortisol plasmático y la anorexigenia producidos en respuesta a estrés, lo que permite proponer a la melatonina como un posible agente anti-estrés en el carpín.
3. El rápido incremento de cortisol producido en respuesta a una exposición aguda a estrés en el carpín, así como su reversión por el tratamiento con melatonina, no parecen estar asociados a cambios en la expresión de genes funcionales del eje HPI.
4. La melatonina *in vitro* reduce la producción y/o liberación de cortisol estimulada por ACTH a través de una acción directa sobre el tejido interrenal. El hecho de que este efecto se observe a concentraciones fisiológicas de la hormona y que esté mediado por receptores específicos sugiere que podría tratarse de una acción fisiológica de la melatonina *in vivo*.
5. Por primera vez en los peces, se observa que la MEL administrada de manera crónica actúa como sincronizador de los ritmos diarios de actividad locomotora en carpines mantenidos en ausencia de los *zeitgebers* ciclo luz-oscuridad y horario

de alimentación, existiendo una sensibilidad diaria a esta acción de la hormona. Este efecto cronobiótico puede estar mediado por acciones de la melatonina sobre los osciladores moleculares presentes en el telencéfalo y el techo óptico.

BIBLIOGRAFÍA

- ARENDT, J., SKENE, D.J. (2005) Melatonin as a chronobiotic. *Sleep Med. Rev.* **9**:25-39.
- BENTLEY, P.J. (2002) Endocrines and osmoregulation. A comparative account in vertebrates. En: *Zoophysiology*. Bradshaw, S.D., Burggren, W., Heller, H.C., Ishii, S., Langer, H., Neuweiler, G., Randall, D.J. (Eds.). Springer, Berlín. pp. 187-231.
- CAHILL, G.M. (2002) Clock mechanisms in zebrafish. *Cell Tissue Res.* **309**:27-34.
- FALCÓN, J., BESSEAU, L., SAUZET, S., BOEUF, G. (2007) Melatonin effects on the hypothalamo-pituitary axis in fish. *Trends Endocrinol. Metab.* **18**:81-88.
- GIROTTI, M., WEINBERG, M.S., SPENCER, R.L. (2009) Diurnal expression of functional and clock-related genes throughout the rat HPA axis: system-wide shifts in response to a restricted feeding schedule. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. E* **296**:888-897.
- NADER, N., CHROUSOS, G.P., KINO, T. (2010) Interactions of the circadian clock system and the HPA axis. *Trends Endocrinol. Metab.* **21**:277-286.
- RAO, N.V.A., RAZA, B., PRASAD, J.K., RAZI, S.S., GOTTARDO, L., AHMAD, M.F., NUSSDORFER, G.G. (2001) Melatonin decreases glucocorticoid blood concentration in the rat and palm squirrel, acting directly on the adrenal gland. *Biomed. Res.* **22**:115-117.
- REITER, R.J. (1991) Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. *Endocr. Rev.* **12**:151-180.
- SAITO, S., TACHIBANA, T., CHOI, Y.-H., DENBOW, D.M., FURUSE, M. (2005) ICV melatonin reduces stress responses in neonatal chicks. *Behav. Brain Res.* **165**:197-203.
- SHEARMAN, L.P., SRIRAM, S., WEAVER, D.R., MAYWOOD, E.S., CHAVES, I., ZHENG, B., KUME, K., LEE, C.C., VAN DER HORST, G.T., HASTINGS, M.H., REPERT, S.M. (2000) Interacting molecular loops in the mammalian circadian clock. *Science* **288**:1013-1019.
- TORRES-FARFÁN, C., RICHTER, H.G., GERMAIN, A.M., VALENZUELA, G.J., CAMPINO, C., ROJAS-GARCÍA, P., FORCELLEDO, M.L., TORREALBA, F., SERÓN-FERRÉ, M. (2003) Maternal melatonin selectively inhibits cortisol production in the primate fetal adrenal gland. *J. Physiol.* **554**:841-856.
- VON GALL, C., GARABETTE, M.L., KELL, C.A., FRENZEL, S., DEGHANI, F., SCHUMM-DRAEGER, P.-M., WEAVER, D.R., KORF, H.-W., HASTINGS, M.H., STEHLE, J.H. (2002) Rhythmic gene expression in pituitary depends on heterologous sensitization by the neurohormone melatonin. *Nat. Neurosci.* **5**:234-238.
- WILLIAMS, J.A. (2004) Molecular analysis of circadian rhythms: nonmammalian vertebrates. En *Molecular biology of circadian rhythms*. Sehgal, A. (Ed.). Hoboken, NJ: John Wiley & Sons. pp. 75-92.

INTRODUCTION

The reduction of the unavoidable impact related to fish handling is one of the main challenges for current aquaculture. Physiological responses to these procedures entail the activation of hypothalamus-pituitary-interrenal axis (HPI). Such activation stimulates hypothalamic corticotropin releasing factor (CRF) release, whose binding to specific receptors (CRF-R1) in the pituitary is a key signal for the proopiomelanocortin (POMC) processing and adrenocorticotropin (ACTH) production. This peptide binds to specific receptors (MC2R) in the steroidogenic cells of interrenal tissue, which activate StAR protein and facilitate cholesterol entering to the mitochondria, where it is enzymatically transformed to finally produce and release cortisol to the general blood stream (Bentley, 2002).

Melatonin (MEL) is a neurohormone mainly synthesised in the pineal gland and retina of almost all vertebrates so far studied. Its synthesis shows a daily pattern with high levels during the dark phase and low levels during the photophase, in both diurnal and nocturnal animals (Reiter, 1991). MEL is a key molecule of the vertebrate circadian system, and it acts as a synchronizer of several rhythmic functions to cyclic environmental changes (Arendt and Skene, 2005). For the last years, MEL has been proposed to play a role as a modulator of the stress responses in some vertebrate species (Rao *et al.*, 2001; Saito *et al.*, 2005), being scarce the studies about this issue in fish.

The circadian system of fish is multioscillatory, and is considered as a network of different clocks that work independently, although intercommunicate among them (Falcón *et al.*, 2007). Each one of these oscillators is autorregulated by positive and negative feedback loops that drive the transcription and translation of the so-called clock genes (*per* and *cry* belonging to the negative loop, *bmal1* and *clock* to the positive loop), with an approximate period of 24 h (Nader *et al.*, 2010).

This PhD Thesis aims to study the functional aspects of teleost HPI axis and its relevance as a possible target for MEL effects, considering goldfish (*Carassius auratus*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) as experimental models. With this general aim, the following specific objectives have been addressed: 1. To investigate the existence of circadian oscillator(s) in the HPI axis by studying the expression of clock genes and functional genes of the axis during a whole 24 h cycle. 2. To deep into the study of the relaxant effect of MEL in resting conditions and under stress exposure, investigating the effect of the hormone on circulating (cortisol, glucose and lactate), behavioural (food intake and locomotor activity) and genetic (expression of HPI axis functional genes) aspects. 3. To determine the existence of possible targets for MEL in

the HPI axis. 4. To delve into the possible synchronizing role of MEL on locomotor activity, clock genes expression and brain monoamines content in the absence of light/dark cycle and feeding time as *zeitgebers*.

RESEARCH CONTENTS

1. Daily rhythmicity in goldfish HPI axis.

To investigate the possible circadian rhythmicity of the HPI axis in goldfish, we examine the daily expression of clock genes and some functional genes of the axis. Goldfish are acclimated during 4 weeks to a 12L:12D photoperiod (lights on at 7:30 h) and scheduled daily feeding at 10:30 h, recording continuously the locomotor activity. The hypothalamus, pituitary and interrenal were sampled at 3 h intervals during a whole 24-h cycle to quantify the expression of HPI axis functional genes (*crf precursor* in the hypothalamus, *crf-r1* and *pomc* in the pituitary, and *mc2r* and *star* in the interrenal tissue), and clock genes (*per1a*, *per2a*, *per3*, *cry1a*, *cry2a*, *cry3*, *clock1a*, *bmal1a* and “*clock2-like*”, in the three locations).

Goldfish show an activity rhythm with a periodicity of 24 h, with significantly higher values during the photophase and a marked food anticipatory activity. These results demonstrate synchronization to the *zeitgebers* light/dark cycle and scheduled feeding time. Related to the HPI axis functional genes, only *crf-r1* shows a daily significant rhythm of expression, suggesting that the possible circadian rhythmicity of the HPI axis would not depend on rhythmic expression of the analysed genes, although a regulation at post-transcriptional levels cannot be discarded. On the other hand, the expression of all the clock genes analysed show daily significant rhythms at the 3 levels of the HPI axis (except *per2a*, that is expressed rhythmically only in the hypothalamus, and *cry1a*, that does not show oscillations in the interrenal tissue). The temporal profiles of expression of each gene are very similar in all the studied tissues: the acrophases of *per1a*, *per3*, *cry1a* and *cry3* are in the dark/light transition, in antiphase with *bmal1a*, *clock1a* and “*clock2-like*” rhythms, whose acrophases are in the light/dark transition. These profiles agree with the ones previously described in other fish species, independently of their chronotype, and in similar studies in mammals (Cahill, 2002; Girotti *et al.*, 2009). The acrophases of *per1a* and *cry3* rhythms are immediately prior to the light onset, suggesting anticipation to the photophase and/or to the food arrival. The acrophase of *per3* rhythm timed immediately before food administration, suggesting that feeding time could be the main synchronizer that drives the expression rhythms of this gene. The expression of *cry1a* shows a maximum at the beginning of the photophase in the hypothalamus and pituitary, indicating that light can be a more potent synchronizer than feeding time for this gene in central tissues. The

rhythm of *per2a* in the hypothalamus displays its acrophase in the middle of the light period, supporting that this gene is light-inducible in photosensitive oscillators. Regarding to the genes of the positive loop, their rhythmic expression profiles are highly conserved in teleost, but show marked differences compared to data from mammals and *Drosophila* (Shearman *et al.*, 2000; Williams, 2004), which can suggest different regulatory mechanisms and/or functions of these genes throughout phylogeny.

2. Melatonin treatments and HPI axis.

To deep into the relaxing effect of MEL in goldfish, the hormone was administered by two different ways: intraperitoneal (IP, peripheral) and intracerebroventricular (ICV, central), during 7 and 4 days, respectively. IP administered MEL, but not ICV, significantly reduces plasma cortisol levels and daily locomotor activity (including diurnal, nocturnal and food anticipatory activity), indicating a peripheral role of this hormone in the regulation of both parameters. On the other hand, the relaxing effect of MEL on locomotor activity does not seem to be a direct consequence of its anorectic effect, as 10 days of food restriction (50% of usual food ration) does not significantly modify either daily locomotor activity or plasma cortisol levels in goldfish.

The possible effects of IP MEL administration (2 and 20 µg/g) on the physiological responses to acute stress (1 min of air exposure) have been studied in goldfish. Stress exposure increases circulating cortisol and reduces food intake, without any significant change in glycemia and locomotor activity. MEL administration counteracts both effects at 2 h post-injection, showing also a reduction of locomotor activity at both 2.5 and 24 h post-injection. Altogether these results reveal MEL as a possible anti-stress hormone in goldfish.

To investigate whether these effects of MEL can be mediated through the HPI axis, we analysed possible changes in the expression of some functional genes of the axis: *crf precursor* in the hypothalamus, *crf-r1* and *pomc* in the pituitary, and *mc2r* and *star* in the kidney. MEL administration (20 µg/g) during 4 days reverses the increase of *star* expression induced by exposure to an acute stress protocol (5 min of handling), suggesting that interrenal tissue can be a target candidate for the anti-stress action of this hormone.

3. Possible targets for MEL in the HPI axis.

To delve into the study of the possible targets in the HPI axis for MEL-induced plasma cortisol reduction, firstly a preliminary experiment of HPI axis activation by exogenous administration of ACTH (50 and 200 ng/g) is performed. This stimulation

triggers a primary response to stress, with a significant increase in plasma cortisol levels, without affecting other circulating metabolites (glucose and lactate) or behavioural parameters (food intake and locomotor activity). From these results, we perform the following experiment to determine whether IP-injected MEL (20 µg/g) is able to counteract the HPI axis stimulation induced by CRF (1 µg/µl, ICV injection) or ACTH (50 ng/g, IP injection). The administration of both peptides induces the expected stimulation of HPI axis, with a significant increase in circulating cortisol at 2 h post-injections. However, this effect is not counteracted by the previous treatment with MEL, suggesting that supraphysiological activation of the HPI axis, as the one performed in our design, could mask the MEL-induced reduction of circulating cortisol.

To investigate whether cortisol reduction induced by MEL is exerted by a direct action on interrenal tissue, *in vitro* assays are performed, comparing the response of two teleost species: goldfish and rainbow trout. Goldfish interrenal tissue is cultured in two systems, superfusion and static, analysing the effect of MEL (1-100 nM), with or without luzindole (a general antagonist of MEL receptors, 1 µM), on ACTH-stimulated tissue (50 nM). Trout interrenal tissue is cultured in a static system and stimulated with ACTH (1,3 µM) in the presence of MEL (0,1-10 nM), with or without luzindole (1 µM). MEL (1-100 nM) reduces the total amount and the maximum level of cortisol released by ACTH-stimulated goldfish interrenal tissue, without modifying basal release. Besides, the recovery of basal levels after ACTH stimulation is faster in the tissues treated with MEL. These effects of the neurohormone seem to be mediated by melatonergic receptors, as they are reversed, at least partially, by luzindole pre-treatment. In rainbow trout, results are very similar to the ones found in goldfish, with a reduction in ACTH-stimulated cortisol release after MEL addition (0,1-10 nM) and a significant reversion of this effect after pre-incubation with luzindole. At present, the mechanism underlying this effect of MEL in fish is unknown, although *in vitro* studies in mammals suggest an inhibitory action on steroidogenic enzymes mediated by MT1 receptors (Torres-Farfán *et al.*, 2003).

4. MEL as a synchronizer in goldfish.

Finally, we investigate the possible effect of a chronic treatment with MEL on the synchronization of daily locomotor activity rhythms, clock genes expression and brain monoamines content in goldfish in the absence of light/dark cycle and feeding time *zeitgebers*. With this aim, we carry out a first experimental design, acclimating goldfish to a 12L:12D photoperiod (lights on at 7:00 h) and scheduled feeding at 10:00 h during 14 days. Then, environmental conditions change to constant light and random feeding (absence of *zeitgebers*), and 8 days afterwards fish are IP-injected with MEL (1

µg/g) at either 9:00 h (CT2) or 21:00 h (CT14) during 8 days (control fish were injected with saline), increasing the dose to 5 µg/g for the following 7 days. Then, the protocol of injections is reversed, i.e. saline-treated fish are injected with MEL and vice versa. After 11 days, injections are finished, maintaining constant light and random feeding conditions, to finally return to 12L:12D photoperiod and scheduled feeding at 10:00 h during 7 days. Locomotor activity is registered throughout the experiment. Goldfish maintained under 12L:12D and scheduled feeding conditions show a diurnal pattern of locomotor activity with a circadian periodicity ($\tau = 24.0$ h) that is lost in the absence of both *zeitgebers*. Treatment with MEL synchronizes locomotor activity in a dose-dependent manner, restoring a rhythm similar to the one observed in the presence of *zeitgebers*, but only when injected at 21:00 h (and not at 9:00 h). This synchronizing effect remains for 7 days after exogenous hormone withdrawal and disappears progressively, which does not support a hypothetical masking effect of the injections.

Then, this experiment was performed again but only until MEL-injections (5 µg/g) phase, administering the hormone only at 21:00 h. After this period, telencephalon and optic tectum are sampled at 6 h intervals during a whole 24-h cycle to analyse clock genes expression (*per1*, *per2*, *per3* and *cry3*) and to quantify monoamines content (epinephrine, norepinephrine, dopamine, L-DOPA, DOPAC, serotonin and 5-HIAA). Chronic MEL synchronizes *per1a* and *per3* expression in telencephalon and optic tectum, and *cry3* in telencephalon. This agrees with results in mammals (Von Gall *et al.*, 2002), and suggests that the hormone could be acting on the molecular machinery of the oscillators to generate clock genes rhythms that finally would drive daily locomotor activity synchronization. Regarding to monoamines, MEL-treated goldfish show a rhythm in dopamine turnover in telencephalon and dopamine and serotonin in optic tectum. However, our results do not allow concluding that the synchronization of locomotor activity by MEL is mediated by a modulation in brain monoamines content.

CONCLUSIONS

From these results, we suggest the following conclusions:

1. For the first time in fish, the hypothalamus, pituitary and interrenal tissue are proposed as functional oscillators that would constitute possible nodes in the network of the goldfish circadian system. These oscillators do not seem to drive the rhythmic transcription of certain HPI axis functional genes, although alternative regulations at different post-transcriptional levels cannot be discarded.

2. Melatonin exerts a peripheral relaxant effect in goldfish, by reducing locomotor activity and counteracting the stress-induced plasma cortisol increase and anorexia. This suggests the hormone as a possible anti-stress agent in goldfish.
3. Both the quick increase of cortisol induced by acute stress exposure in goldfish, and its reversion by MEL treatment does not seem to be mediated by changes in HPI axis functional genes expression.
4. Melatonin *in vitro* reduces the production and/or release of cortisol by a direct action on the ACTH-stimulated interrenal tissue in the two teleosts studied: goldfish and rainbow trout. This effect is observed at physiological concentrations of melatonin and is mediated by specific receptors, suggesting that this could be a physiological action of this hormone *in vivo*.
5. For the first time in fish, chronically administered melatonin is shown to synchronize locomotor activity rhythms in the absence of light/dark cycle and feeding time *zeitgebers*. Our results also suggest the existence of a daily sensitivity to this chronobiotic action of melatonin. The synchronizing effect of this hormone on locomotor activity can be exerted directly on the molecular oscillators in telencephalon and optic tectum.

REFERENCES

- ARENDT, J., SKENE, D.J. (2005) Melatonin as a chronobiotic. *Sleep Med. Rev.* **9**:25-39.
- BENTLEY, P.J. (2002) Endocrines and osmoregulation. A comparative account in vertebrates. En: *Zoophysiology*. Bradshaw, S.D., Burggren, W., Heller, H.C., Ishii, S., Langer, H., Neuweiler, G., Randall, D.J. (Eds.). Springer, Berlín. pp. 187-231.
- CAHILL, G.M. (2002) Clock mechanisms in zebrafish. *Cell Tissue Res.* **309**:27-34.
- FALCÓN, J., BESSEAU, L., SAUZET, S., BOEUF, G. (2007) Melatonin effects on the hypothalamo-pituitary axis in fish. *Trends Endocrinol. Metab.* **18**:81-88.
- GIROTTI, M., WEINBERG, M.S., SPENCER, R.L. (2009) Diurnal expression of functional and clock-related genes throughout the rat HPA axis: system-wide shifts in response to a restricted feeding schedule. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **E 296**:888-897.
- NADER, N., CHROUSOS, G.P., KINO, T. (2010) Interactions of the circadian clock system and the HPA axis. *Trends Endocrinol. Metab.* **21**:277-286.
- RAO, N.V.A., RAZA, B., PRASAD, J.K., RAZI, S.S., GOTTARDO, L., AHMAD, M.F., NUSSDORFER, G.G. (2001) Melatonin decreases glucocorticoid blood concentration in the rat and palm squirrel, acting directly on the adrenal gland. *Biomed. Res.* **22**:115-117.
- REITER, R.J. (1991) Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. *Endocr. Rev.* **12**:151-180.
- SAITO, S., TACHIBANA, T., CHOI, Y.-H., DENBOW, D.M., FURUSE, M. (2005) ICV melatonin reduces stress responses in neonatal chicks. *Behav. Brain Res.* **165**:197-203.
- SHEARMAN, L.P., SRIRAM, S., WEAVER, D.R., MAYWOOD, E.S., CHAVES, I., ZHENG, B., KUME, K., LEE, C.C., VAN DER HORST, G.T., HASTINGS, M.H., REPPERT, S.M.

- (2000) Interacting molecular loops in the mammalian circadian clock. *Science* **288**:1013-1019.
- TORRES-FARFÁN, C., RICHTER, H.G., GERMAIN, A.M., VALENZUELA, G.J., CAMPINO, C., ROJAS-GARCÍA, P., FORCELLEDO, M.L., TORREALBA, F., SERÓN-FERRÉ, M. (2003) Maternal melatonin selectively inhibits cortisol production in the primate fetal adrenal gland. *J. Physiol.* **554**:841-856.
 - VON GALL, C., GARABETTE, M.L., KELL, C.A., FRENZEL, S., DEHGHANI, F., SCHUMM-DRAEGER, P.-M., WEAVER, D.R., KORF, H.-W., HASTINGS, M.H., STEHLE, J.H. (2002) Rhythmic gene expression in pituitary depends on heterologous sensitization by the neurohormone melatonin. *Nat. Neurosci.* **5**:234-238.
 - WILLIAMS, J.A. (2004) Molecular analysis of circadian rhythms: nonmammalian vertebrates. En *Molecular biology of circadian rhythms*. Sehgal, A. (Ed.). Hoboken, NJ: John Wiley & Sons. pp. 75-92.

